

**Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Urinsteroidausscheidung
von Frühgeborenen größer 30 Schwangerschaftswochen mit Hilfe
der Gaschromatografie/Massenspektrometrie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Bianka Grofer
aus Lich

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung Allgemeinpädiatrie und Neonatologie, Leiter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. M. Heckmann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H.-R. Tinneberg

Tag der Disputation: 02.02.2010

Meinem Mann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Ziele der Studie	10
3. Patienten und Methoden	11
3.1. Patienten	11
3.2. Methoden	14
3.2.1. Urinsammlung	14
3.2.2. Patientendaten	18
3.2.3. Laboruntersuchung	19
3.2.4. Statistische Verfahren	22
3.2.5. Ethische Aspekte	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Die Probanden	24
4.2. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW	27
4.2.1. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW im longitudinalen Verlauf und Untersuchungen zur Modulation durch die Schwere der Erkrankung und die postnatale Gewichtszunahme	27
4.2.2. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW verglichen mit der Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen kleiner 30 SSW.	32
4.3. Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW	33

4.3.1.	Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW bezogen auf die Gesamtsteroideausscheidung	33
4.3.2.	Einfluss des Geschlechts und der Schwere der Erkrankung auf die Produktionsrate der fetalen Steroide	34
4.3.3.	Vergleich der Ausscheidungsraten fetaler Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW mit denen von Frühgeborenen kleiner 30 SSW und reifen Neugeborenen	37
4.3.4.	Untersuchungen zu Regulationsmechanismen der Produktionsraten von Glukokortikoiden und fetalen Steroiden bei Frühgeborenen größer 30 SSW	38
5.	Diskussion	39
5.1.	Die Probanden	39
5.1.1.	Anzahl und Gestationsalter der Probanden	39
5.1.2.	Die Gruppierung der Probanden	39
5.2.	Die Methode: 24-Stunden-Urinsammlung	41
5.3.	Die Kortisolproduktion von Frühgeborenen größer 30 SSW	44
5.3.1.	Longitudinale Bestimmung der Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW als integraler Parameter der adrenalen Funktion	44
5.3.2.	Einfluss der Schwere einer Erkrankung und der postnatalen Gewichtszunahme auf die Kortisolproduktionsrate bei Frühgeborenen größer 30 SSW	45
5.3.3.	Die Kortisolproduktionsrate von Frühgeborenen größer 30 SSW im Vergleich zu Frühgeborenen kleiner 30 SSW	47
5.3.4.	Klinische Bedeutung der niedrigen Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW	49

5.4.	Die Fetalzonensteroide von Frühgeborenen größer 30 SSW	53
5.5.	Die Regulation der Nebennierenrinde beim Feten und Frühgeborenen	55
5.6.	Limitationen der Studie und Ausblick in die Zukunft	57
6.	Zusammenfassung	59
7.	Summary	61
8.	Literaturverzeichnis	63
9.	Anhang	74
9.1.	Abstract (eingereicht zur Publikation in „Neonatology“)	74
9.2.	Score for neonatal acute physiology (SNAP)	90

1. Einleitung

Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 30 und 37 Schwangerschaftswochen (SSW) repräsentieren ein Drittel aller Kinder, die auf neonatologischen Stationen behandelt werden. Über die Funktion ihrer Nebennierenrinde (NNR) gibt es jedoch im Gegensatz zu sehr unreifen Frühgeborenen kleiner 30 SSW, die etwa zehn Prozent des neonatologischen Krankenguts ausmachen, nur wenige Untersuchungen.

Die Entwicklung der Nebennierenrinde während der Fetal- und Neonatalzeit

Während der Fetal- und Neonatalzeit ist die Entwicklung der NNR durch dramatische Veränderungen in Größe, Morphologie und Funktion geprägt [97].

Ihre funktionelle Entwicklung ist ein hochkomplexer Vorgang, der die Expression verschiedener für die Steroidproduktion relevanter Enzyme in verschiedenen Zonen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Gestation umfasst [19]. Bereits in der frühen Schwangerschaft produziert die „fetale Zone“ (Fetalzone) der NNR Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S). Ab der 28. SSW wird in der so genannten „Übergangszone“ Kortisol „de novo“ synthetisiert [85]. Die dritte Zone der fetalen NNR, die so genannte „definitive Zone“, verfügt über die Kapazität, Mineralokortikoide zu produzieren. Sie wird jedoch erst kurz vor der Geburt aktiviert [62]. Am Ende der Schwangerschaft entspricht das Gewicht der Nebenniere des Feten fast dem der Nebenniere eines Erwachsenen [12].

Die Kortisolproduktionsrate bei reifen Neugeborenen und Frühgeborenen

Pränatal wird der Kortisolmetabolismus in einem komplexen Zusammenspiel von fetaler Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPAA) und Plazenta reguliert. Das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das sowohl vom fetalen Hypothalamus als auch von der Plazenta gebildet wird, reguliert die Ausschüttung des Adrenocorticotropen-Hormons (ACTH). ACTH, ein Hormon, das im Vorderlappen der fetalen Hypophyse synthetisiert wird, fördert wiederum das Wachstum der NNR, deren Differenzierung und die Steroidogenese [53].

Während der Schwangerschaft ist Kortisol wichtig für die strukturelle und funktionelle Entwicklung zahlreicher Organsysteme wie die der Leber, des Zentralen Nervensystems oder der Lunge [47] – zu hoch konzentriert kann es den Feten jedoch auch schädigen [23].

Durch die 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II der Plazenta wird der Kortisolspiegel des Feten in engen Grenzen konstant gehalten. Das Enzym wandelt aktives fetales Kortisol in inaktives Kortison um, vermutlich, um das Kind vor einem zu hohen Kortisolspiegel zu schützen [9, 66]. Für diese These sprechen auch Untersuchungen an Tieren, die gezeigt haben, dass hohe Kortisolkonzentrationen das Wachstum und die Reifung verschiedener Organe hemmen [17, 45, 51].

Postnatal ist Kortisol wichtig, um Stress, Erkrankungen oder Operationen zu bewältigen: es stabilisiert den Blutzucker, erhält den Blutdruck aufrecht und schützt den Körper vor einer überschießenden Stressantwort, indem es das Immunsystem reguliert [59].

Mit der Geburt fällt der plazentare Regulationsmechanismus abrupt weg. Ab diesem Zeitpunkt steuert die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse allein die Sekretion der Glukokortikoide. Für eine optimale extrauterine Adaptation ist es essentiell, dass diese Achse

normal funktioniert. Bei Frühgeborenen wird das Zusammenspiel von Plazenta und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPAA) durch die vorzeitige Geburt zu früh beendet. Zwar sprechen einige Studien dafür, dass die HPAA dieser Kinder durch pharmakologische Tests annähernd so stimulierbar ist wie die reifer Neugeborener oder Erwachsener [30, 61], jedoch scheint die adrenale Antwort auf Stress bei diesen Kindern noch unreif im Sinne eines abgeschwächten oder sogar fehlenden Kortisolanstiegs zu sein [27].

Die Glukokortikoidproduktion von Frühgeborenen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Jedoch beziehen sich die meisten Arbeiten auf sehr unreife Frühgeborene mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW. Die Datenlage zu älteren Frühgeborenen größer 30 SSW ist spärlich und zum Teil widersprüchlich:

Economou et al [22] fanden bei Frühgeborenen (durchschnittliches Gestationsalter 32 SSW), die unter einem Atemnotsyndrom litten, signifikant höhere Kortisolwerte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Sie schlossen daraus, dass Kinder dieses Alters bereits über eine reife adrenale Stressantwort verfügen. Gestützt wurden ihre Ergebnisse durch die Beobachtung, dass Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 33 und 36 SSW direkt nach dem „Stressereignis Geburt“ erhöhte Kortisolkonzentrationen aufwiesen [21].

Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien kein Unterschied ermittelt werden bezüglich des Plasmakortisolspiegels von kranken und gesunden Frühgeborenen [46, 98].

Bei *Scott et al* [78] wiesen Frühgeborene (Gestationsalter: 32 bis 35 SSW), die mit Surfactant behandelt wurden, initial sogar signifikant niedrigere Kortisolkonzentrationen auf als die gesunde Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der meisten Untersuchungen über die adrenale Funktion von Frühgeborenen beruhen auf pharmakologischen Tests der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse oder auf

Einzelmessungen des Plasmakortisolspiegels und stellen somit lediglich Momentaufnahmen dar. Genauere Angaben über die Steroidproduktionsraten sind möglich, wenn man die Urinexkretion der Glukokortikoide und fetalen Steroide mit Hilfe einer 24-Stunden-Sammlung bestimmt [102, 44]. Studien haben gezeigt, dass 24-Stunden-Urinproben von Erwachsenen 75% der Kortisolproduktionsrate (KPR) widerspiegeln [44]. *Heckmann et al* [32] stellten ein nicht-invasives Verfahren zur Urinsammlung bei Kindern vor. Dabei wird der Urin in Cellulose-Windeln gesammelt und dann mit einer hydraulischen Presse zurück gewonnen. Anschließend werden die Konzentrationen der Glukokortikoid-Metabolite und die der fetalen Steroide mittels Gaschromatographie/ Massenspektrometrie bestimmt (s. a. Patienten und Methoden).

Mit Hilfe dieser nicht-invasiven Methode untersuchten *Heckmann et al* [31] bereits sehr unreife Frühgeborene mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW. Sie bestimmten die KPR der Kinder als einen integralen Parameter der adrenalen Funktion – zum einen während der Neonatalperiode unter dem Einfluss von Erkrankung und zum anderen während des Wachstums bis zur Entlassung. Dabei kamen sie zu folgenden Ergebnissen: Bei Frühgeborenen kleiner 30 SSW hat die Schwere der Erkrankung keinen Einfluss auf die KPR. Lediglich 27% der kranken Frühgeborenen wiesen eine über den dreifachen Median der „gesunden“ Frühgeborenen erhöhte KPR auf. Diese erhöhte KPR war jedoch nicht mit einem klinischen Vorteil assoziiert – im Gegenteil: diese Kinder hatten sogar eine signifikant höhere Hirnblutungsrate. Während des Wachstums – also nach der Neonatalperiode – konnten die Frühgeborenen kleiner 30 SSW die Produktion des katabolen Hormons Kortisol herunter regulieren.

Die Produktionsrate fetaler Steroide und die Involution der Fötalzone bei reifen Neugeborenen und Frühgeborenen

In der fetalen Zone der NNR werden aufgrund des Fehlens der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase die so genannten 3β -Hydroxy-5-en-Steroide gebildet [56, 0069]. Diese stellen bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW 90% aller Steroide dar [55, 34]. Das Hauptprodukt der Fetalzone, Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S), sezernieren Feten 4- bis 5-mal mehr als Erwachsene [15].

Bei reifen Neugeborenen nehmen die DHEA-S-Konzentration im Plasma und die Ausscheidung der 3β -Hydroxy-5-en-Steroide mit dem Urin nach der Geburt innerhalb weniger Wochen ab [80, 20]. Die fetale Zone bildet sich zurück. Gesteuert wird dieser apoptotische Prozess durch Aktivin A und einen transformierenden Wachstumsfaktor [85]. Mit Ende des ersten Lebensjahres ist die fetale Zone komplett verschwunden [12].

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Involution bei Frühgeborenen später – und zwar erst mit Erreichen der korrigierten 40. Schwangerschaftswoche (SSW) postmenstruell beginnt [56, 55, 34]. So lange persistieren bei diesen Kindern die hohen Spiegel der fetalen Steroide [24, 29, 70, 71]. In Untersuchungen von *Midgley et al* [55, 56] und *Heckmann et al* [34] erreichten Frühgeborene mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW erst in einem postmenstruellen Altern von 40 SSW das Exkretionsniveau reifer Neugeborener. Danach ging die Ausscheidungsrate der Fetalzonensteroiden zurück und die Involution begann. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Aktivität der Fetalzone nicht vom Zeitpunkt der Geburt abhängt sondern vom Gestationsalter.

Welche physiologische und klinische Rolle die postnatal anhaltend hohen DHEA-S-Spiegel bei Frühgeborenen spielen ist noch unklar. Intrauterin ist DHEA-S das Substrat für die Östrogenbiosynthese der fetoplazentaren Einheit [83]. Es garantiert damit Wachstum und Durchblutung des Uterus

während der Schwangerschaft. Diskutiert wird, dass der hohe Spiegel des fetalen Androgens postnatal die Entstehung von Lungenerkrankungen begünstigt [89].

Die Regulation der Exkretion fetaler Steroide und Glukokortikoide

ACTH, ein Hormon aus dem Vorderlappen der Hypophyse steuert die Aktivität der Nebennierenrinde. Lange Zeit galt das Hormon als einziger Stimulus. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass weitere Faktoren existieren, die die Funktion der NNR – unabhängig von ACTH oder in Zusammenarbeit mit dem Hypophysenhormon – beeinflussen.

So konnten *Midgley et al* [55] bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW keinen Zusammenhang zwischen Plasma-Konzentrationen von ACTH und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) oder ACTH und der Ausscheidung von 3β -Hydroxy-5-en-Steroiden mit dem Urin feststellen. Sie schlossen daraus, dass die Sekretion fetaler Androgene und Glukokortikoide bei Frühgeborenen nicht nur durch ACTH, sondern durch verschiedene Faktoren gesteuert wird. Untersuchungen an reiferen Frühgeborenen und Tieren legen ähnliche Vermutungen nahe [79, 38]. Welche Faktoren außer ACTH die Aktivität der Fetalzone regulieren, ist jedoch noch unklar.

2. Ziele der Studie

Die Ziele dieser prospektiven Studie sind:

1. Longitudinale Bestimmung der Kortisolproduktionsrate (KPR) – als integraler Parameter der adrenalen Funktion – bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 Schwangerschaftswochen (SSW) mittels Messung der Urinsteroidekretionsraten durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) in 24-Stunden-Urinproben.
2. Untersuchung des Einflusses der Schwere der Erkrankung auf die Höhe der KPR mit der Hypothese, dass aufgrund der Reifung des adrenalen Stress-Systems bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 30 und 36 SSW die Schwere der Erkrankung und die KPR positiv miteinander korrelieren. Die KPR und die Reaktion auf Erkrankung bei Frühgeborenen größer 30 SSW sollen weiterhin mit den Ergebnissen bei unreiferen Frühgeborenen kleiner 30 SSW verglichen werden.
3. Longitudinale Untersuchung der Produktionsrate fetaler Steroide, um den Prozess der Involution der Fötalzone bei Frühgeborenen größer 30 SSW beschreiben zu können. Wiederum sollen die Produktionsrate fetaler Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW mit denen Frühgeborener kleiner 30 SSW und reifen Neugeborenen verglichen werden, um Aussagen über den gestationsalterabhängigen zeitlichen Verlauf der Involution der Fötalzone treffen zu können.
4. Um die Regulation der Exkretion fetaler Steroide und Glukokortikoide zu untersuchen, sollen die Ausscheidungsraten der fetalen Steroide mit denen der Glukokortikoide verglichen werden.

3. Patienten und Methoden

3.1. Patienten

Einschlusskriterien

Alle Frühgeborenen über 30 SSW, die im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Gießen zwischen 11/2001 und 11/2002 betreut wurden. Das Gestationsalter wurde mit Hilfe des Ballard-Score [5] und/oder anhand des Datums der letzten mütterlichen Menstruation bestimmt.

Ausschlusskriterien

Frühgeborene, die eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllten, wurden von der Studie ausgeschlossen:

- schwere Fehlbildungen des Thorax, des Abdomens oder der inneren Organe
- Vitium cordis mit Ausnahme eines persistierenden Ductus arteriosus botalli, eines offenen Foramen ovale oder ASD II
- Hydrops fetalis, Chromosomenaberrationen
- Fehlbildungen, Funktionsstörungen oder Anomalien der endokrinen Organe (z. B. Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom, Intersex etc.)
- postnatale Steroidtherapie; eine pränatale Betamethasonprophylaxe bei der Mutter war kein Ausschlusskriterium.

Gruppeneinteilung

Die Probanden wurden in die beiden Gruppen „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ (well preterm infants) und „kranke Frühgeborene“ (ill preterm infants) eingeteilt.

Um der Kontrollgruppe „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ zugeteilt zu werden, mussten während, sowie 48 Stunden (bzw. 0/24 Stunden für die Tage 1 und 2) vor und nach der Sammelperiode die unten genannten Kriterien erfüllt sein. Das Intervall 48 Stunden wurde gewählt, da sich der Plasmakortisolspiegel reifer Neugeborener 48 Stunden nach einer Operation normalisiert hatte [63].

- **Beatmung:** Bei beatmeten Probanden mussten die Parameter unter den Kriterien für eine Surfactanttherapie ($\text{FiO}_2 > 0,4$) liegen, da Frühgeborene, die Surfactant benötigen, niedrigere Kortisolspiegel aufweisen als gesündere Kinder [78].
- **Kreislauf:** Es durfte keine arterielle Hypotension vorliegen [13]. Eine Erythrozyten-Transfusion war kein Ausschlusskriterium, es durfte jedoch keine Schocktherapie z. B. mit Ringerlösung, Humanalbumin, Frischplasma oder Katecholaminen während des Untersuchungsintervalls durchgeführt worden sein.
- **Infektion:** Eine akute oder unbeherrschte bakterielle Infektion war bei Linksverschiebung im peripheren Blutbild (Immature-to-total-Ratio $> 0,2$) und erhöhtem CRP ($> 10 \text{ mg/l}$) ein Ausschlusskriterium, wenn diese 48 Stunden vor, während oder nach der Probengewinnung aufgetreten war.
- **ZNS:** Es durfte keine Intraventrikuläre Hämorrhagie vorliegen [64].
- **Stoffwechsel:** Innerhalb von 48 Stunden vor, während oder nach der Probengewinnung galten die folgenden Grenzen für:
 - Blutzucker: 40-200 mg/dl
 - Hyperbilirubinämie unterhalb der Austauschgrenze
 - Base Excess $\geq -10 \text{ mmol/l}$.
- **Anderer Stress:** Venen- und andere Punktionen [50], Transporte oder aufwendige Pflege wurden nicht eindeutig definiert. Sie waren auch beim „wenig beeinträchtigten Frühgeborenen“ häufig unvermeidbar. Daher stellten sie kein Ausschlusskriterium dar. Apnoen und

Bradykardien, die durch Unreife bedingt waren, waren ebenfalls keine Ausschlusskriterien.

Die Probanden der Gruppe „**krankte Frühgeborene**“ litten unter einer oder mehrerer der folgenden Krankheiten:

- Atemnotsyndrom mit Surfactanttherapie
- konnatale Infektion (CRP > 10mg/l und Symptome einer Infektion in den ersten 72 Lebensstunden)
- nosokomiale Infektion (CRP > 10mg/l und Symptome einer Infektion nach den ersten 72 Lebensstunden)
- Intraventrikuläre Hämorrhagie (gemäß den Kriterien von Papile [64])

Um die nach klinischen Kriterien erfolgte Einteilung zu objektivieren, wurde der „Score for Neonatal Acute Physiology“ (SNAP) erhoben [74, 73].

3.2. Methoden

3.2.1. Urinsammlung

Sammelzeitpunkte

In der ersten Lebenswoche erfolgte an den Tagen 1,2,3 und 5 eine 24-Stunden-Urinsammlung. In den Lebenswochen 2, 3 und 4 (Neonatalperiode) wurde an jeweils einem Wochentag Urin gesammelt, danach je einmal pro Monat – bis maximal einen Monat nach dem errechneten Geburtstermin.

Für die engmaschige Sammelperiodik in der ersten Woche gibt es zwei Gründe: 1) Der Geburtsstress führt in den ersten Tagen zu einem Kortisolanstieg mit raschen Abfall [36] und 2) die Inzidenz neonataler Erkrankungen ist in den ersten Lebenstagen am höchsten [36].

Sammelmethode

Bei den kranken Frühgeborenen lag zum Teil ein Blasenkatheter, da der erhöhte intraabdominelle Druck die Lungen- und Kreislauffunktionen der Kinder beeinträchtigte [75]. Ihr Urin wurde dementsprechend in dem Katheterbeutel gesammelt.

Bei Kindern ohne Blasenkatheter wurde der Urin durch das Auspressen von Zellulose-Windeln gewonnen. Bislang war die Standardmethode zum Urinsammeln bei Früh- und Neugeborenen ein über das Genitale des Kindes geklebter Plastikbeutel. Diese Methode hat jedoch einige Nachteile: Zum einen ist die Haut Frühgeborener sehr vulnerabel, so dass die Cutis beim Abziehen des Beutels verletzt werden kann. Zum anderen löst sich der Beutel oft bei Bewegungen des Kindes ab.

Es wurde daher eine alternative Sammelmethode gewählt: der Urin wurde in Windeln aus reiner Zellulose gesammelt (Pampers®, Procter & Gamble, Schwalbach). Diese standen in zwei Größen (16g und 22g) zur

Verfügung. Die kleinen Windeln wurden für Kinder mit einem Gewicht unter 2,3kg genutzt, die großen für Frühgeborene, die 2,3-6kg wogen. Während der 24-Stunden-Sammelperiode wurden die Windeln alle 4 Stunden gewechselt.

Evaluation der 24-Stunden-Urinprobensammlung

Die fraktionierte Urinsammlung mit Hilfe von Einmalwindeln wurde 1985 von *Roberts* und *Lucas* [76] vorgestellt und durch *Ahmad et al* [1] abgewandelt. Diese Studien zeigten, dass sich aus Urinproben, die aus Einmalwindeln gewonnen werden, eine Reihe von Urinparametern zuverlässig bestimmen lassen.

In Vorversuchen wurde das Verfahren von *Heckmann et al* [32] evaluiert: Zunächst wurde Urin von Frühgeborenen gesammelt, die jünger als vier Wochen waren. Um eine 24-Stunden-Sammlung zu simulieren, wurde eine bestimmte Proben-Menge in Zellulose-Windeln eingebracht. Kleine Windeln wurden mit 15, 30, 45 ml Urin beträufelt, große Windeln mit 30, 50 und 70ml. Anschließend wurden die Windeln – in Plastiksäcken verpackt – 36 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wurde jede gewogen und schließlich bei -20°C aufbewahrt. Vorsichtig wurden die Windeln nach einigen Tagen wieder aufgetaut. Der Urin wurde mit einer hydraulischen Presse (120kPa/cm²) zurück gewonnen. Die Glukokortikoidmetabolite (GM) und die fetalen Steroide (FS) wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) und „selected ion monitoring“ identifiziert und quantifiziert. Die Kortisolproduktionsraten (KPR) errechnete sich dabei aus der Summe der 14 wichtigsten GM. Die Produktionsrate der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide ergab sich aus der Summe der 17 wichtigsten fetalen Steroide. Der Mittelwert (Standardabweichung) der relativen Rückgewinnungsrate für unterschiedliche Urinvolumina und Windelgrößen betrug für die Summe der GM 106 (1,9) %, für die fetalen Steroide 96 (2,6)%, für die

individuellen GM 105 (12,3)% und für die individuellen fetalen Steroide 91 (8,0)%. Werte über 100% könnten sich durch die Verdunstung und die dadurch bedingten höheren Konzentrationen der Metabolite erklären. Somit hat sich die 24-Stunden-Urinsammlung mittels Zellulosewindeln in Kombination mit der GC/MS als eine nicht-invasive, nicht stressende und vertrauenswürdige Methode zur Beurteilung der KPR bei Frühgeborenen bewährt. Ein Probenvolumen von mindestens 10-12ml zur Steroidanalyse im Doppelansatz wird benötigt.

Vorbereitung und Durchführung der Sammelaktion

Die Zellulose-Windeln wurden der Intensivstation und der neonatologischen Station „Moro“ in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Die Pflegenden wurden über den Ablauf des Urinsammelns informiert und instruiert. Sie wogen alle Windeln zweimal: einmal vor und einmal nach dem Gebrauch. Die sich daraus ergebende Urinmenge wurde auf der Windelvorderseite notiert. Um Verluste durch Verdunstung zu vermeiden, wurden die Windeln einer 24-Stunden-Sammelperiode in einem Plastiksack aufbewahrt, der mit dem Namen des Kindes und dem Datum gekennzeichnet war. Die Windeln wurden spätestens 36 Stunden nach Abschluss der 24-Stunden-Sammelperiode weiterverarbeitet. War dies nicht möglich wurden sie bei -20° C eingefroren, um einen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden. Sie wurden dann zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut und ausgepresst.

Pressvorgang

Der Urin wurde mit einer hydraulischen Presse (120 kPa/cm²) aus den Windeln gepresst. Um die Kontamination der Urinprobe mit Stuhl oder Mekonium auf ein Minimum zu reduzieren, waren die Windeln mit einer dünnen Gaze beschichtet. Diese ließ Urin ins Innere der Windel nicht

aber Stuhl oder Mekonium. Waren Windeln dennoch stark mit Stuhl oder Mekonium kontaminiert, wurden sie verworfen. Litten die Kinder unter Diarrhoe wurde die 24-Stunden-Sammelaktion ausgesetzt.

Kleine Windeln mit weniger als 10ml Urin und große Windeln mit weniger als 12ml Urin wurden verworfen, da man aus ihnen nicht ausreichend Material für die Steroidanalyse auspressen konnte.

Bei allen Windeln wurde zunächst die oberste Schicht (Gaze) entfernt. Die kleinen Windeln wurden dann als Ganzes weiterverarbeitet, die größeren Windeln mussten vor dem Pressen bearbeitet werden. Sie wurden zunächst an beiden Enden aufgeschnitten. Trockene Anteile der Zellulose wurden entfernt, um zu verhindern, dass diese den Urin beim Pressen aufsaugten.

Alle Windeln wurden vor dem Pressen einmal im Schrittbereich gefaltet. Dabei wurde die Faltrichtung so gewählt, dass die Folienseite nach innen und das feuchte Vlies der Windel nach außen gekehrt wurden. So konnte ein zusätzlicher Feuchtigkeitsaustausch innerhalb der Windel vermieden werden. Die gefaltete Windel wurde in einen 1-Liter-Gefrierbeutel (Melitta, Minden, Deutschland) gesteckt. Dieser wurde mit einem Knoten verschlossen. Der Plastikbeutel wurde zwischen die beiden Flächen der hydraulischen Presse gelegt und in mehreren Arbeitsgängen ausgepresst. Zwischendurch wurden die einzelnen Flüssigkeitsansammlungen in einer Beutelecke zusammengeführt. Nachdem der Pressvorgang dreimal wiederholt worden war, wurde die Tüte oberhalb des Flüssigkeitsspiegels aufgeschnitten und der Urin in einen Plastikbehälter abgefüllt. Die Proben wurden dann zentrifugiert und bei -80 °C bis zur Analyse im Steroidlabor aufbewahrt.

Um die Vollständigkeit einer 24-Stunden-Urinsammlung zu überprüfen, wurden die Kreatinin-Ausscheidungsraten mit den von *Wilkins et al* [96] veröffentlichten Daten bei Frühgeborenen verglichen.

3.2.2. Patientendaten

Stammdaten

Bei allen Probanden wurden anhand einer Checkliste folgende Stammdaten erfasst: Gestationsalter aufgrund von Frühschall und Score [5], Geburtsgewicht, Geschlecht, Nabelschnur-pH, 5-Minuten-Apgar, Geburtsmodus (Spontanpartus oder Sectio), Small for gestational age (SGA) definiert als Geburtsgewicht < 10. Perzentile [93], Temperatur bei Aufnahme, Diagnosen bei der Entlassung bzw. Tod des Kindes, Atemnot-Syndrom (ANS) [26], Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) [64], Periventrikuläre Leukomalazie [94], Infektion definiert als CRP > 10 mg/l, nachgewiesene Keime (Blutkultur), Retinopathia praematurorum [90], Nekrotisierende Enterokolitis [10], Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) definiert als $\text{FiO}_2 > 0,21$ am 28. Lebenstag, Chronic Lung Disease (CLD) definiert als $\text{FiO}_2 > 0,21$ bei einem postmenstruellem Alter von 36 SSW [6, 81] und der Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) [74, 73] am Aufnahmetag. Zusätzlich wurden folgende geburtshilfliche und anamnestische Daten erfasst: Familienanamnese bzgl. endokrinologischer Erkrankungen und Indikation für eine vorzeitige Entbindung, Betamethasonprophylaxe. Letztere wurde als komplett definiert, wenn die Mutter mindestens 24 Stunden vor der Geburt zweimal 12 mg Betamethason erhalten hatte. Eine einmalige Betamethasongabe wurde als inkomplette Prophylaxe dokumentiert.

Verlaufsdaten

Wenig beeinträchtigte Frühgeborene: Die Kriterien der Kontrollgruppe (s. o.) wurden anhand einer Checkliste abgefragt. An jedem Sammeltag wurde der SNAP [74, 73] erhoben.

Kranke Frühgeborene: Je nach Erkrankung wurden verschiedene Verlaufs-Daten dokumentiert. Zu Beginn der Erkrankung wurden die Diagnosen (Stammdaten: ANS, IVH etc.) festgehalten. An jedem Sammeltag wurde der SNAP [74, 73] erhoben.

3.2.3. Laboruntersuchung

- Kreatinin wurde in den Urinproben mittels der kinetischen Methode nach Jaffé bestimmt.
- Die Bestimmung der Harnsteroidprofile erfolgte durch die quantitative GC-MS nach der Methode von *Shackleton* [16, 39] im Steroidforschungslabor des Zentrums für Kinderheilkunde (Leiter: Prof. Dr. S.A. Wudy). Die Arbeitsschritte der ausführlich beschriebenen Methode [99] werden im Folgenden kurz dargestellt:

Freie und konjugierte Harnsteroiden wurden mittels Festphasenextraktion (Sep-Pak[®] C18-Kartusche, Fa. Waters, Milford, USA) aus einem 5 ml-Aliquot der 24-Stundenurinmenge extrahiert. Der methanolische Steroidextrakt wurde unter Stickstoffstrom eingetrocknet und in Natriumacetat-Puffer gelöst. Danach wurde eine enzymatische Hydrolyse (Aryl-Sulfatase aus *Helix Pomatia*, Fa. SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Nach einer zweiten Festphasenextraktion der hydrolysierten Steroide und Zugabe von 3 internen Standards (5 α -Androstan-3 α ,17 α -diol, Stigmasterol und Cholesterylbutyrat) erfolgte die Derivatisierung der Harnsteroiden zu Methyloxim-Trimethylsilyl-Ethern. Im Anschluss daran wurde die GC-MS-Analyse durchgeführt. Die Auftrennung der Steroide erfolgte im Gaschromatographen (6890 series GC, Fa. Agilent, Böblingen, Deutschland) auf einer OV-1 fused silica Kapillare (Optima-1-MS, 25 m x 0,2 mm innerer Durchmesser, Filmdicke 0,1 μ m; Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Der Gaschromatograph war mit einem Agilent 7683 series injector ausgestattet. Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch (Agilent

5973N MSD) mittels des "selected ion monitoring" ("SIM"-Modus, Einzelmassenregistrierung, Massenfragmentographie). Dabei wird nicht das gesamte Massenspektrum sondern es werden die Intensitäten einzelner spezifischer Ionenstrahlen registriert. Helium diente als Trägergas. Über die automatische Berechnung der Flächen der betreffenden Peaks wurden die einzelnen Steroidmetaboliten quantifiziert. Die Datenerfassung und Datennachbearbeitung geschah komplett EDV-gesteuert.

Die folgenden C21-Steroide (Glukokortikoidmetabolite) wurden bestimmt:

Tetrahydrokortison (THE; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dion), **α -Kortolon** (α -CL; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α , 21-tetrol-11-on), **β -Kortolon** (β -CL; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-on), **6 α -Hydroxy- α -kortolon** (6 α -OH-THE; 5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α , 20 α ,21-pentol-11-on), **1 β -Hydroxy-tetrahydrokortison** (1 β -OH-THE; 5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,21-tetrol-11,20-dion), **6 α -Hydroxy- α -kortolon** (6 α -OH- α -CL; 5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,20 α ,21-pentol-11-on), **6 α -Hydroxy- β -kortolon** (6 α -OH- β -CL; 5 β -pregnan-3 α ,6 α , 17 α ,20 β ,21-pentol-11-on), **1 β -Hydroxy- β -kortolon** (1 β -OH- β -CL; 5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,20 β ,21-pentol-11-on), **Tetrahydrokortisol** (THF; 5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on), **Allotetrahydrokortisol** (aTHF; 5 α -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on), **α -Kortol** (α -C; 5 β -pregnan-3 α ,11 β , 17 α ,20 α ,21-pentol), **β -Kortolon** (β -C; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-on), **Kortisol** (F; 4-pregnene-11 β , 17 α ,21-triol-3,20-dion) und **6 β -Hydroxy-kortisol** (6 β -OH-F; 4-pregnene-6 β ,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-dion).

Zur Bestimmung der gesamten renalen Glukokortikoidexkretionsraten wurden diese 14 Glukokortikoid-Metaboliten quantifiziert und summiert. Die Interassay- Präzision (n= 8) schwankte zwischen 1,3 % für 6 α -OH- β -

CL und 7,0 % für 1 β -OH- β -CL. Die Intraassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 0,5 % für THE und 5,3 % für 1 β -OH- β -CL.

Die tägliche Urinausscheidungsrate der GM wurde mit dem Körpergewicht und der Kreatininausscheidung korrigiert, um die Schwankungen der glomerulären Filtrationsrate während der ersten Lebenswoche zu berücksichtigen [32].

Die folgenden 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide (Fetalzonensteroid) wurden mittels “selected ion monitoring“ identifiziert:

5-Androsten-3 β -17 α -diol (A⁵-3 β ,17 α ; 5-androsten-3 β ,17 α -diol), **16 α -Hydroxy-dehydroepiandrosteron** (16 α -OH-DHEA; 5-androsten-3 β ,16 α -diol-17-on), **16 β -Hydroxy-dehydroepiandrosteron** (16 β -OH-DHEA; 5-androsten-3 β ,16 β -diol-17-on), **Androstetriol-16 α** (A⁵T-16 α ; 5-androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol), **15 β ,16 α -OH-dehydroepiandrosteron** (15 β ,16 α -OH-DHEA; 5-androstene-3 β , 15 β ,16 α -triol-17-on), **16-O-androstendiol** (16-O-A⁵D; 5-androstene-3 β ,17 β -diol-16-on), **16 α ,18-Hydroxy-dehydroepiandrosteron** (16 α ,18-OH-DHEA; 5-androsten-3 β ,16 α ,18-triol-17-on), **15 β ,17 α -Hydroxy-pregnenolon** (15 β ,17 α -OH-P⁵-olon; 5-pregnene-3 β ,15 β ,17 α -triol-20-on), **16 α -Hydroxy-pregnenolon** (16 α -OH-P⁵-olon; 5-pregnene-3 β ,16 α -diol-20-one), **Androstentetrole** (A⁵-tetrole 1; 5-androstene-3 β ,16 α ,17 β ,18-tetrole und A⁵-tetrol 2; 5-androsten-3 β ,15 β ,16 α ,17 β -tetrol), **15 β -Hydroxy-pregnenetetrol** (15 β -OH-P⁵-tetrol; 5-pregnene-3 β ,15 β ,17 α ,20 α -tetrol), **21-Hydroxy-pregnenolon** (21-OH-P⁵-olon; 5-pregnen-3 β ,21-diol-20-on), **3 β ,20 α ,21-Pregnenetriol** (P⁵-3 β ,20 α ,21-triol; 5-pregnene-3 β ,20 α ,21-triol) und **P⁵-tetrol** (P⁵-tetrol; 5-pregnen-3 β ,16 α ,20 α ,21-tetrol).

Zur Bestimmung der gesamten renalen Exkretionsraten der Fetalzonensteroid wurden diese 15 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide quantifiziert und summiert. Die Interassay- Präzision (n= 8) schwankte

zwischen 1,54 % für A⁵T-16 α und 8,20 % für 16-O-A⁵D. Die Intraassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 0,48 % für A⁵T-16 α und 3,54 % für A⁵-3 β ,17 α .

Auch die tägliche Urinausscheidungsrate der fetalen Steroide wurde mit dem Körpergewicht und der Kreatininausscheidung korrigiert.

3.2.4. Statistische Verfahren

Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft-Excel (Version 7.0). Die statistische Auswertung wurde in der Abteilung für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe des Programms SAS V8 (SAS Institut Inc., Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Die Probanden wurden gemäß der oben geschilderten Kriterien den Gruppen „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ bzw. „kranke Frühgeborene“ zugeteilt. Die Unterschiede zwischen diesen Gruppen wurden mit Hilfe des Median-Test oder des Mann-Whitney-U-Tests (stetige Variablen) bzw. des Fischer-Tests (kategorische Variablen) verglichen. Mittels logistischer Regressionsanalyse wurden die Effekte der Schwere der Erkrankung (gemessen als SNAP) und verschiedener Co-Variablen auf die KPR und die Produktionsrate der fetalen Steroide untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Für weitere Analysen der Daten und Grafiken wurde das Programm Statistica[®] (Version 6) verwendet (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3.2.5. Ethische Aspekte

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Giessen hat der Durchführung der Studie zugestimmt (AZ.: 04/02).

Das Sammeln des Urins mit Hilfe von Windeln, die sowieso alle vier Stunden gewechselt worden wären, stellte keine zusätzliche Belastung des Frühgeborenen dar.

Die Eltern wurden innerhalb der ersten fünf Lebenstage ihres Kindes mündlich und schriftlich (mit Hilfe eines Informationsblattes) von einem Ober- oder Stationsarzt über das Ziel, die praktische Durchführung, mögliche Risiken und den zu erwartenden Nutzen der Studie informiert. Ihnen wurde eine Einverständniserklärung vorgelegt, in der sie festhalten konnten, ob ihr Kind an der Studie teilnehmen sollte oder nicht. Die Eltern wurden darauf hingewiesen, dass sie ihre Erklärung jederzeit revidieren könnten. Alle Daten der Frühgeborenen, die an der Studie teilnahmen, wurden anonymisiert erfasst und ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Die Probanden

Anzahl und Gestationsalter der Probanden

Die Probanden der Studie waren Frühgeborene mit einem Gestationsalter größer 30 Schwangerschaftswochen (SSW), die am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Gießen betreut wurden. Die Studie wurde von 11/2001 bis 11/2002 durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden 96 Frühgeborenen größer 30 SSW auf der Intensivstation bzw. der neonatologischen Station „Moro“ aufgenommen, 79 von ihnen nahmen an der Studie teil. 17 Kinder wurden aus folgenden Gründen ausgeschlossen: Ablehnung der Studie durch die Eltern, Erfüllung eines oder mehrerer Ausschlusskriterien (s. u.).

Die Probanden waren bei ihrer Geburt durchschnittlich 33,4 ($\pm 1,7$) SSW alt und wogen im Mittel 1980 (± 437) g. Die Verteilung des Gestationsalters der 79 Probanden ist in Abbildung 1 dargestellt. 41% der Kinder wurden mit einem Gestationsalter kleiner 33 SSW geboren, 59% waren reifer als 33 SSW.

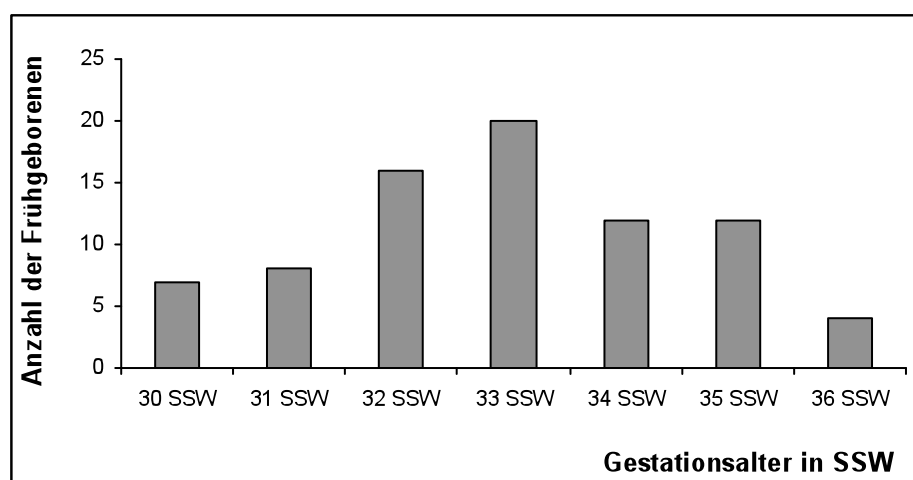


Abb. 1: Verteilung des Gestationsalters der 79 Probanden nach Schwangerschaftswochen (SSW).

Gruppierung der Probanden

Von den 79 in die Studie aufgenommenen Frühgeborenen wurden 59 Kinder der Gruppe „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ und 20 der Gruppe „kranke Frühgeborene“ zugeteilt. Tabelle 1 zeigt die Verteilung wichtiger neonataler Charakteristika, wie Gestationsalter, Geschlecht, pränatale Steroidgabe, Geburtsmodus etc., die in beiden Gruppen nicht unterschiedlich verteilt waren.

Tab. 1: Die Verteilung der neonatalen Charakteritika in den Gruppen „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ und „kranke Frühgeborene“ ist mit Angabe des Signifikanzniveaus dargestellt.

	wenig beeinträchtigte FG (n=59)	kranke FG (n=20)	p
Gestationsalter [Wochen]*	33,5 (30,0-36,9)	33,3 (30,0-35,6)	0,36 [#]
Geburtsgewicht [g]*	1980 (1120-2920)	2055 (1090-2700)	0,68 [#]
Geschlecht (♀/♂)	22 / 37	5 / 15	0,42 ^{##}
SGA	5 (8%)	3 (15%)	0,41 ^{##}
Pränatale Steroide (komplett)	22 (37%)	5 (25%)	0,42 ^{##}
Pränatale Steroide (komplett und inkomplett)	27 (46%)	7 (35%)	0,44 ^{##}
Sectio	57 (96%)	18 (90%)	1,0 ^{##}
Art. Nabelschnur-pH*	7,3 (7,2-7,4)	7,3 (7,1-7,6)	0,30 [#]
5-Min.-Apgar*	9 (5-10)	9 (1-10)	0,17 [#]

* Median und Minimum-Maximum, [#]Mann-Whitney-U-Test, ^{##}Fischers exakter Test, FG: Frühgeborene, SGA: small for gestational age

Art und Schwere der Erkrankung

Wie erwartet, waren die Inzidenzen von Atemnotsyndrom (ANS) und konnataler Infektion in der Gruppe der kranken Frühgeborenen hoch. Im Einzelnen wurden folgende neonatale Erkrankungen diagnostiziert: konnatale Infektion (CRP > 10 mg/l während des 1. - 3. Lebenstags): 12/20 (60 %), nosokomiale Infektion (CRP > 10mg/l, ab 72 Stunden postnatal): 3/20 (15%), ANS mit Surfactantgabe: 5/20 (25%), ANS (insgesamt): 11/20 (55%), Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) I°: 2/20 (10 %).

Vier von 20 (20%) kranken Frühgeborenen entwickelten eine arterielle Hypotension und mussten mit Katecholaminen behandelt werden. Eine Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde nicht beobachtet. Keines der kranken Frühgeborenen starb vor der Entlassung. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Krankheiten in der Gruppe der kranken Frühgeborenen.

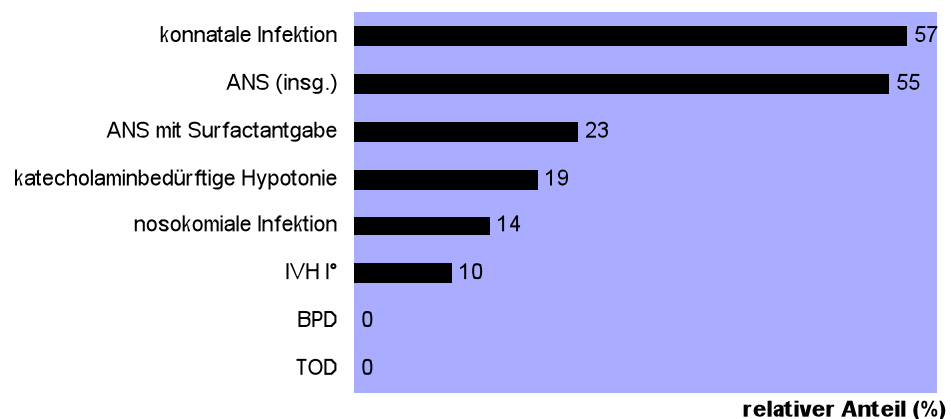


Abb.2: Verteilung der Krankheiten in der Gruppe der kranken Frühgeborenen. Angabe in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der kranken Frühgeborenen. ANS (Atemnotsyndrom), IVH (Intraventrikuläre Hämorrhagie), BPD (Bronchopulmonale Dysplasie).

Die Abbildung 3A (S. 28) zeigt die Schwere der Erkrankung (gemessen als SNAP) bei den kranken und den wenig beeinträchtigten Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter. Das Maximum der SNAP-Werte fand sich in der ersten Lebenswoche. Während dieser Zeit hatten die kranken Frühgeborenen mit Ausnahme von Tag 2 signifikant höhere SNAP-Werte als die wenig beeinträchtigten Kinder (Median-Test).

4.2. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW

4.2.1. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW im longitudinalen Verlauf und Untersuchungen zur Modulation durch die Schwere der Erkrankung und die postnatale Gewichtszunahme

Die Abbildung 3B zeigt die Kortisolproduktionsraten (KPR; $\mu\text{g/kg/d}$ pro mg Kreatinin) bei den kranken und den wenig beeinträchtigten Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter.

Die Mediane der KPR ($\mu\text{g/kg/d/mg}$ Kreatinin) betrugen bei kranken (wenig beeinträchtigten) Frühgeborenen an Tag 1: 31 (28); Tag 2: 24 (28); an Tag 3: 27 (26); Tag 5: 28 (17); Woche 2: 20 (19); Woche 3: 17 (19); Woche 4: 16 (16) und Monat 2: 17 (23).

Die Abbildung 3C zeigt die Gewichtsentwicklung bei den kranken und den wenig beeinträchtigten Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter. Nach dem 5. Lebenstag nahmen die Frühgeborenen an Gewicht zu (Abb. 3C). Die KPR änderte sich jedoch nicht signifikant (Spearman-Rank-Analyse).

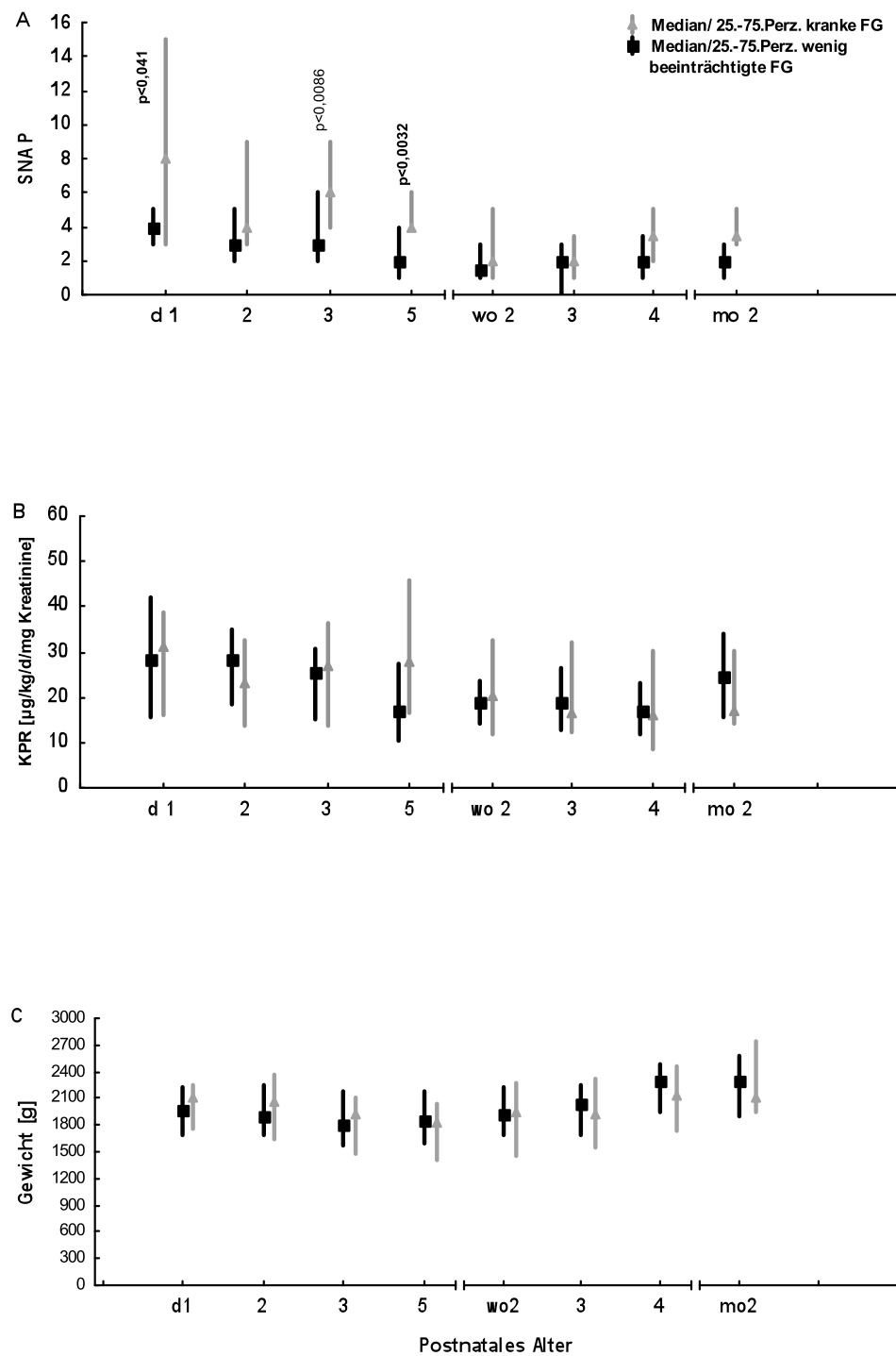


Abb. 3: Die Schwere der Erkrankung quantifiziert durch den Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) (A), die Veränderungen der Kortisolproduktionsrate (KPR, korrigiert auf die Kreatininausscheidung) (B), die Entwicklung des Gewichts (C) – jeweils von wenig beeinträchtigten und kranken Frühgeborenen bezogen auf das postnatale Alter (Median, 25.-75. Perz.).

Abbildung 4 zeigt die Verteilung der Maxima von SNAP und KPR während der ersten beiden Lebensmonate. Die Maxima von SNAP und KPR lagen in der ersten Lebenswoche.

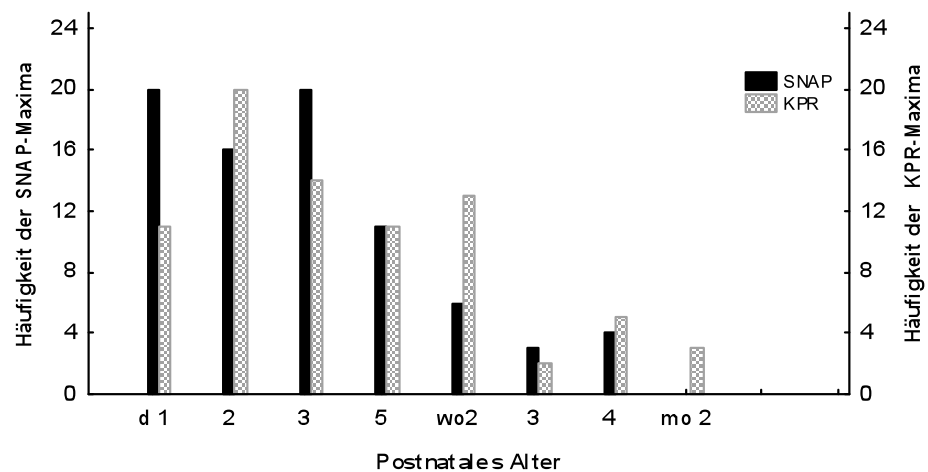


Abb. 4: Verteilung der SNAP-Maxima und der KPR-Maxima bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW in den ersten beiden Lebensmonaten.

Um die individuelle Stressantwort analysieren zu können, wurde zunächst eine univariate Analyse durchgeführt, die eine signifikante Korrelation zwischen dem maximalen SNAP und dem Maximum der KPR (OR 3,7 (95% CI 1,2-11,5); $p = 0,02$) zeigte. Auch nach Hinzunahme weiterer Einflussfaktoren wie Gestationsalter ($p = 0,0035$), Geburtsmodus ($p = 0,19$), Geschlecht ($p = 0,7$) und pränatale Steroidtherapie ($p = 0,13$) in einer logistischen Regressionsanalyse blieb der Einfluss des maximalen SNAP auf die maximale KPR signifikant ($p = 0,02$). Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der Regressionsanalyse zusammen.

Zusätzliche Analysen mit den gleichen Co-Variablen zeigten, dass die Schwere der Erkrankung (gemessen an der Höhe des SNAP) sowohl mit der Höhe des Anstiegs der KPR (Differenz zwischen minimaler und maximaler KPR; $p = 0,005$) als auch mit der KPR-Anstiegsgeschwindigkeit (Zeit zwischen Tag 1 und dem Tag des Maximums der KPR; $p = 0,02$) positiv korrelierte (Tab. 3 und Tab. 4).

Tab. 2: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf das **Maximum der Kortisolproduktionsrate** (KPR als abhängige Variable dichotomisiert am Median) ($n=67$).

	OR	95% Konfidenzintervall	p
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	3,7	1,2 11,5	0,02
Geschlecht (♀ vs ♂)	1,3	0,4 4,4	0,70
Gestationsalter (<33 SSW vs > 33 SSW)	11,4	6,7 58,8	0,0035
Pränatale Steroide (nicht komplett vs keine)	0,2	0,02 1,6	0,13
Pränatale Steroide (komplett vs keine)	0,2	0,04 1,1	0,064
Section caesarea	0,2	0,03 2,0	0,19

OR: odds ratio, vs: versus, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology

Tab. 3: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf die **Höhe des Anstieges der Kortisolproduktionsrate** (n=36).

	OR	95% Konfidenzintervall	p	
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	50	3,3	100	0,005
Geschlecht (♀ vs ♂)	5	0,5	100	0,15
Gestationsalter (<33 SSW vs > 33 SSW)	10	0,5	142,9	0,14
Pränatale Steroide nicht komplett vs keine)	0,9	0,02	33,3	0,97
Pränatale Steroide (komplett vs keine)	1	0,12	10	0,94
Section caeserea	0,6	0,02	10	0,77

OR: odds ration, vs: versus, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology

Tab. 4: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf die **Anstiegsgeschwindigkeit der Kortisolproduktionsrate** (n=36).

	OR	95% Konfidenzintervall	p	
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	10	1,42	50	0,02
Geschlecht (♀ vs ♂)	5	0,7	33,3	0,12
Gestationsalter	1,1	1	10	0,91
Pränatale Steroide (nicht komplett vs keine)	0,53	0,03	10	0,64
Pränatale Steroide (komplett vs keine)	1,1	0,14	10	0,91
Section caeserea	0,9	0,04	10	0,94

OR: odds ration, vs: versus, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology

4.2.2. Die Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW verglichen mit der Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen kleiner 30 SSW.

Die Mediane der KPR ($\mu\text{g/kg/d}$ per mg Kreatinin) der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW waren verglichen mit den Medianen der KPR sehr unreifer Frühgeborener (Gestationsalter unter 30 SSW) signifikant um den Faktor 1.5 bis 3.0 niedriger (Median-Test, Abb.5).

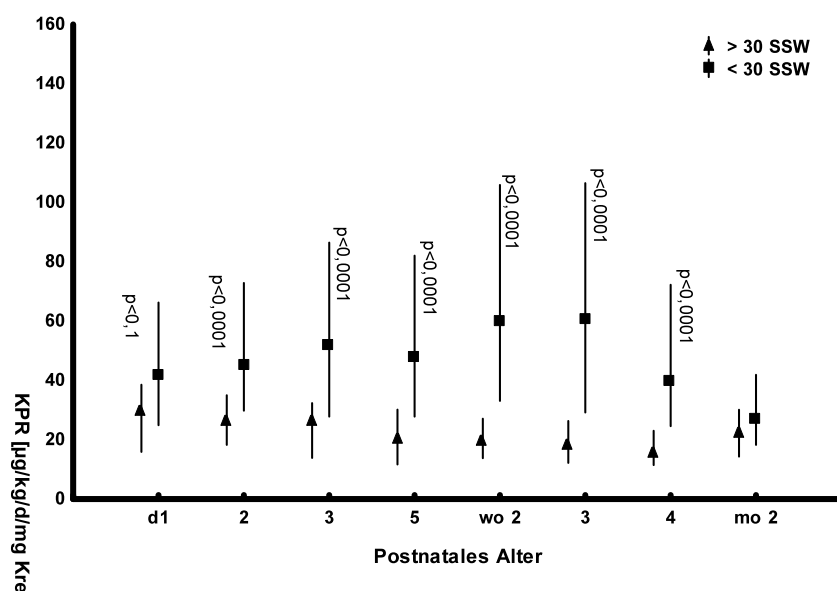


Abb. 5: Die Kortisolproduktionsraten (KPR) von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW verglichen mit der KPR von Frühgeborenen kleiner 30 SSW.

4.3. Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW

4.3.1. Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW bezogen auf die Gesamtsteroidausscheidung

Über den beobachteten Zeitraum (1. Lebenstag bis 2. Lebensmonat) betrug die Ausscheidungsrate der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide mehr als 90% der Gesamtsteroidausscheidungsrate (Tabelle 5).

Tab. 5: Vergleich der Harn-Exkretionsraten der summierten 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide und der summierten Glukokortikoidmetabolite bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW in Abhängigkeit vom postnatalen Alter.

Postnatales Alter (Median)	Summe der 3 β -OH-5-en-Steroide (μ g/kg/d), Median (Quartile)	Summe der Glukokortikoidmetabolite (μ g/kg/d), Median (Quartile)	Anteil der 3 β -OH-5-en-Steroide an der Gesamtsteroidexkretion (%)
1. Tag	1836 (1371–2103)	143 (76-263)	93
2. Tag	2180 (859–3082)	182 (134-271)	92
3. Tag	2974 (1855–4821)	180 (119-289)	94
5. Tag	3351 (1839-4941)	159 (92-221)	95
2. Woche	3332(1822-5390)	150 (97-211)	94
3. Woche	2979 (1454-4514)	139 (96-257)	96
4. Woche	2386 (1432-2609)	137 (92-185)	95
2. Monat	2851 (2067-3854)	191 (128-241)	94

Der Median (25.-75. Perz.) der Ausscheidungsrate der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide stieg während der ersten Lebenswoche von 1836 (1371-2103) μ g/kg/d/mg Kreatinin auf ein Maximum von 3332 (1822-5390) μ g/kg/d/mg Kreatinin in der 2. Woche an ($p < 0,05$, 1. Tag zu 2. Woche).

4.3.2. Einfluss des Geschlechts und der Schwere der Erkrankung auf die Produktionsrate der fetalen Steroide

Die Ausscheidungsraten der männlichen Frühgeborenen größer 30 SSW unterschieden sich nicht signifikant von denen der weiblichen Frühgeborenen größer 30 SSW.

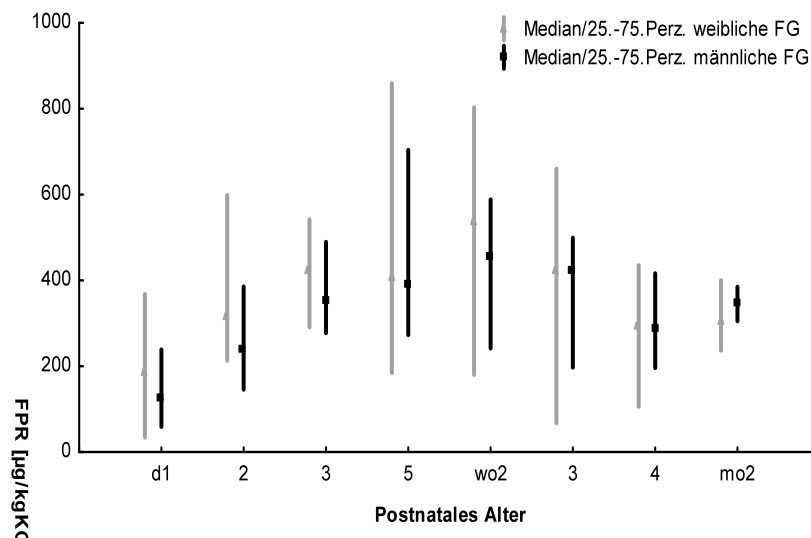


Abb. 6: Mediane der Ausscheidungsraten fetaler Steroide von männlichen Frühgeborenen größer 30 SSW im Vergleich zu weiblichen Frühgeborenen größer 30 SSW. FPR: Produktionsrate der fetalen Steroide

Um den Einfluss der Schwere einer Erkrankung auf die Produktion der fetalen Steroide zu untersuchen, wurde eine logistische Regressionsanalyse unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen (z. B. Geburtsmodus etc.) durchgeführt. Diese zeigte keine signifikante Korrelation zwischen dem maximalen SNAP und dem Maximum der Produktionsrate der fetalen Steroide (FPR) (OR 1,6 (95% CI 0,6-4,4); $p = 0,32$). Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der Regressionsanalyse zusammen. Zusätzliche Analysen mit den gleichen Co-Variablen ergaben, dass die

Schwere der Erkrankung (gemessen an der Höhe des SNAP) weder mit der Höhe des Anstiegs der FPR (Differenz zwischen minimaler und maximaler FPR; $p = 0,26$) noch mit der FPR-Anstiegsgeschwindigkeit ($p = 0,57$) korrelierte (Tab. 7 und Tab. 8).

Tab. 6: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf das **Maximum der Produktionsrate der fetalen Steroide** (FPR als abhängige Variable, dichotomisiert am Median) (n=67).

	OR	95% Konfidenzintervall	p
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	1,6	0,6 4,4	0,32
Geschlecht (♀ vs ♂)	1,2	0,4 3,4	0,80
Gestationsalter (<33 SSW vs > 33 SSW)	1,6	0,5 5,3	0,45
Pränatale Steroide (nicht komplett vs keine)	0,7	0,1 3,8	0,68
Pränatale Steroide (komplett vs keine)	0,8	0,2 2,6	0,67
Section caesarea	0,56	0,08 4,1	0,57

OR: odds ratio, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology, vs: versus

Tab. 7: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf die **Höhe des Anstieges der Produktionsrate der fetalen Steroide** (n=36).

	OR	95% Konfidenzintervall	p	
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	2,5	0,5	12,3	0,26
Geschlecht (♀ vs ♂)	0,9	0,2	4,4	0,85
Gestationsalter (<33 SSW vs > 33 SSW)	4,6	0,6	38,5	0,16
Prä. Steroide (nicht komplett vs keine)	1,2	0,1	12,6	0,89
Prä. Steroide (komplett vs keine)	1,9	0,24	14,7	0,55
Section caeserea	1,5	0,1	32,3	0,79

OR: odds ration, vs: versus, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology

Tab. 8: Logistische Regressionsanalyse des Einfluss des maximalen SNAP (dichotomisiert am Median) unter Berücksichtigung verschiedener Co-Variablen auf die **Anstiegsgeschwindigkeit der Produktionsrate der fetalen Steroide** (n=36).

	OR	95% Konfidenzintervall	p	
Maximum SNAP (dichotomisiert am Median)	1,5	0,4	6,8	0,57
Geschlecht (♀ vs ♂)	0,6	0,1	2,8	0,49
Gestationsalter	3,7	0,5	28,6	0,21
Pränatale Steroide (nicht komplett vs keine)	0,9	0,1	8,6	0,89
Pränatale Steroide (komplett vs keine)	0,4	0,05	2,7	0,33
Section caeserea	1,0	0,06	18,5	0,98

OR: odds ration, vs: versus, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology

4.3.3. Vergleich der Ausscheidungsraten fetaler Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW mit denen von Frühgeborenen kleiner 30 SSW und reifen Neugeborenen

Abbildung 6 zeigt die Produktionsraten der fetalen Steroide von Frühgeborenen größer 30 SSW verglichen mit denen von Frühgeborenen kleiner 30 SSW [31] und reifen Neugeborenen [100] – bezogen auf das postmenstruelle Alter. Zu erkennen ist, dass die Ausscheidungsraten der Frühgeborenen größer 30 SSW signifikant niedriger sind als die der Frühgeborenen kleiner 30 SSW und höher als die der reifen Neugeborenen. Ab der 38. Woche nähern sich die Werte der Frühgeborenen größer 30 SSW den Werten der reifen Neugeborenen an.

Außerdem ist zu erkennen, dass Frühgeborene mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW die Werte der reifen Neugeborenen 2 Wochen später, also erst ab der 40. Woche erreichen.

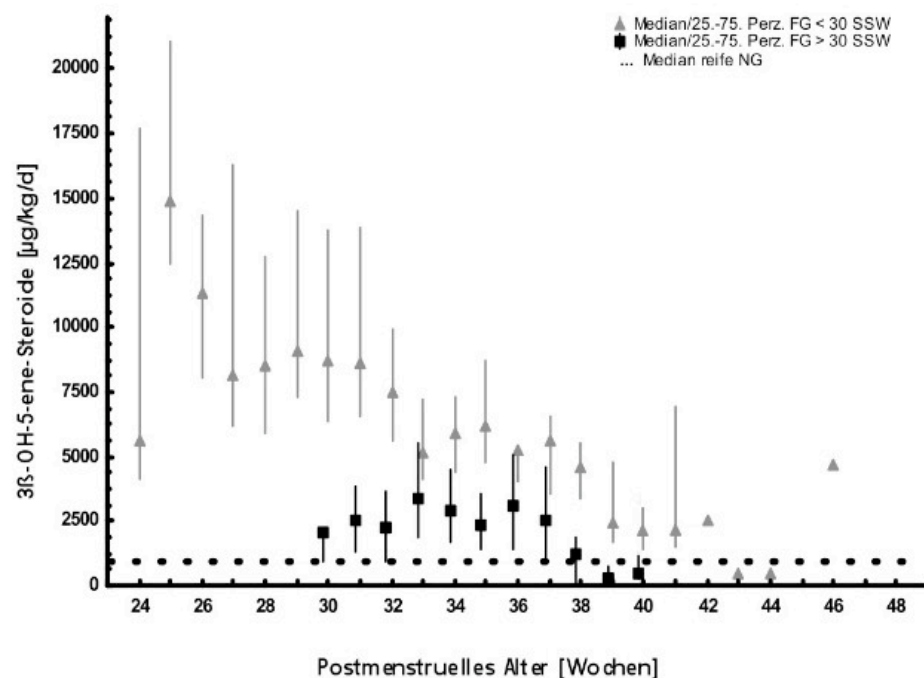


Abb. 7: Mediane der Ausscheidungsraten fetaler Steroide von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW im Vergleich zu Frühgeborenen mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW und reifen Neugeborenen.

4.3.4. Untersuchungen zu Regulationsmechanismen der Produktionsraten von Glukokortikoiden und fetalen Steroiden bei Frühgeborenen größer 30 SSW

Um zu untersuchen, ob die Produktion der fetalen Steroide und der Glukokortikoide bei Frühgeborenen größer 30 SSW der gleichen Regulation unterliegen könnten, verglichen wir die jeweiligen Faktoren, um die sich die Ausscheidungsraten der fetalen Steroide und der Glukokortikoidmetabolite von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt änderten mittels Spearman-Rang-Analyse (Abb. 8). Bis einschließlich der 4. Lebenswoche fand sich mit Ausnahme von Tag 3 auf Tag 5 ein signifikanter Zusammenhang.

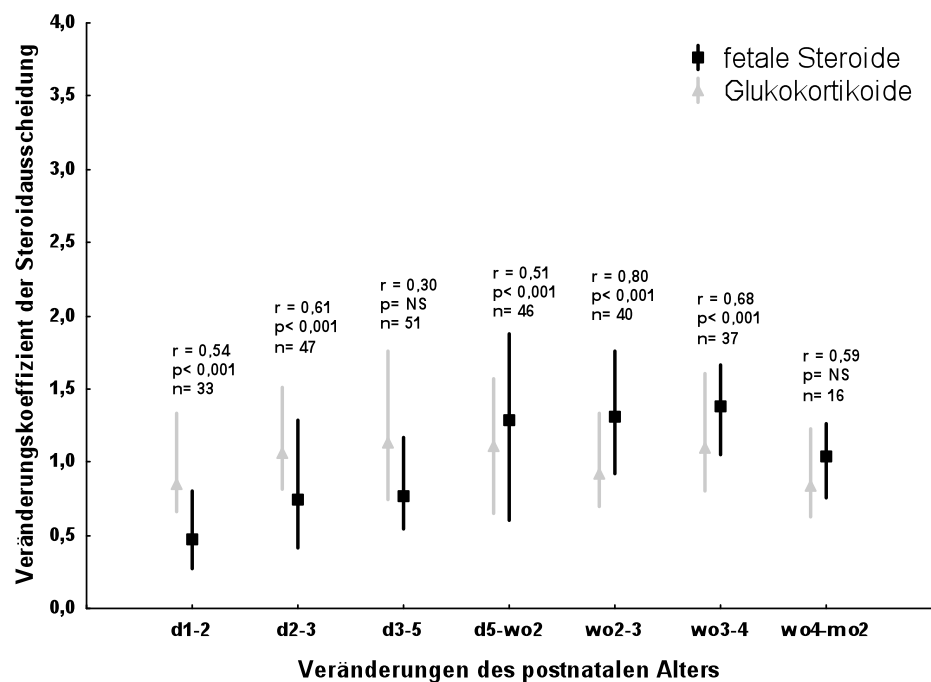


Abb. 8: Koeffizienten der Veränderung der Exkretionsraten der Glukokortikoidmetabolite und fetalen Steroide (Median, Quartile) von einem Messzeitpunkt zum nächsten bei Frühgeborenen > 30 SSW. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Rang-Analyse.

5. Diskussion

5.1. Die Probanden

5.1.1. Anzahl und Gestationsalter der Probanden

Das Probandengut der vorliegenden Studie umfasst 79 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter größer 30 SSW – darunter 27 (34%) weibliche und 52 (65%) männliche Kinder. Die Probanden wurden longitudinal über die ersten beiden Lebensmonate untersucht. In diesem Zeitraum wurde bei jedem Kind bis zu acht Mal 24-Stunden-Urin gesammelt.

Bislang beschränkte sich der Untersuchungszeitraum der meisten Studien über die adrenale Funktion von Frühgeborenen auf die erste Lebenswoche [78, 46, 87]. Es liegt nur eine einzige longitudinale Untersuchung vor, die über die 4. Lebenswoche hinausgeht - allerdings wurden in dieser Frühgeborene mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW untersucht [98].

Verglichen mit anderen Untersuchungen, an denen zwischen 22 und 30 Frühgeborene teilnahmen [46, 22, 98], ist die Zahl der Probanden der vorliegenden Studie deutlich höher. *Tamer et al.* [87] untersuchten in einer Studie mit 79 Kindern eine gleich hohe Zahl Frühgeborener größer 30 SSW. Allerdings bestimmten sie die Funktion der Nebennierenrinde (durch die Messung des Plasmakortisolspiegels) nicht longitudinal, sondern lediglich an zwei festgelegten Zeitpunkten – und zwar direkt nach der Geburt und am 3. Lebenstag.

5.1.2. Die Gruppierung der Probanden

Bei vielen der bisher durchgeführten Studien mit Frühgeborenen größer 30 SSW fällt auf, dass diese keine einheitliche Definition vom Schweregrad der Erkrankung verwendet haben [46, 78, 22, 98]. Auf mögliche Symptome einer adrenalen Insuffizienz wurde lediglich in einer Arbeit eingegangen [78]. Dies könnte erklären, warum die ermittelten Serumkortisolwerte der kranken Frühgeborenen so stark voneinander abweichen. Siehe hierzu auch

Tabelle 10 (Diskussionsteil S.52) : „Studien über die Kortisolproduktionsraten (KPR) von Frühgeborenen“. Bei der Verwendung von Scores [74, 73] zur Graduierung lassen sich erhebliche Unterschiede in der Schwere der Erkrankung zwischen einzelnen Frühgeborenen feststellen [36].

Bei der Bewertung der adrenalen Funktion und damit auch der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPAA) von Frühgeborenen größer 30 SSW ist die Definition der Kontrollgruppe immer problematisch. Da Feten mit einem entsprechenden Gestationsalter als Kontrollgruppe aus mehreren Gründen (fetoplazentare Einheit, unterschiedliches intra- und extrauterines Stressmilieu etc.) ausscheiden, werden in den meisten Studien [46, 22, 98] „gesunde“ Frühgeborene zu diesem Zweck herangezogen. Aber: Frühgeburtlichkeit ist kein physiologischer Zustand. Die Kinder sind daher nicht gesund, sondern allenfalls „wenig beeinträchtigt“ oder „well“ – wie es im angloamerikanischen Sprachgebrauch häufig umschrieben wird.

In den bisherigen Studien variierte die Definition von „well“ sehr stark – von einem Kriterium, das die Kinder erfüllen mussten, bis hin zu einer ganzen Reihe von Kriterien [78, 46, 22, 98]. Die unterschiedlichen Definitionen lassen dabei wichtige Aspekte missen. So schloss beispielsweise nur eine Untersuchung den Blutzucker als Kriterium mit ein [22]. Außerdem erschweren die unterschiedlichen Definitionen den Vergleich der ermittelten Kortisolwerte.

Unter Berücksichtigung der Kritikpunkte an den vorgestellten Untersuchungen haben wir die Probanden in der vorliegenden prospektiven Studie nach strengen, klinischen Kriterien in zwei Gruppen eingeteilt (Kriterien s. Kapitel „Patienten und Methoden“): erstens die Gruppe „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“, zweitens die Gruppe „kranke“ Frühgeborene“. Objektiviert wurde diese klinische Gruppierung durch die Erhebung des „Score for Neonatal Acute Physiology“ (SNAP) [73]. Dieser täglich neu erhobene Score schließt 28 physiologische Variablen ein und korreliert gut mit der Mortalität.

Von den 79 Frühgeborenen größer 30 SSW, die an der vorliegenden Studie teilnahmen, wurden 59 der Gruppe „wenig beeinträchtigte Frühgeborene“ und 20 der Gruppe „kranke Frühgeborene“ zugeteilt.

Am häufigsten und am schwersten krank waren die Kinder in der ersten Lebenswoche. Wie erwartet war die Inzidenz für Atemnotsyndrom (55%) und konnatale Infektion (57%) hoch.

Im Vergleich zu einer Studie an unreiferen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 30 SSW [31] waren jedoch die SNAP-Werte unserer Probanden um das Vierfache niedriger. Mit anderen Worten, die reiferen Frühgeborenen waren bei weitem nicht so einem Krankheitsstress ausgesetzt wie die unreiferen Frühgeborenen.

5.2. Die Methode: 24-Stunden-Urinsammlung

In der vorliegenden Studie ermittelten wir erstmals die Steroidexkretion im Urin von Frühgeborenen größer 30 SSW mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) und „selected ion monitoring“.

Die Ergebnisse der meisten Untersuchungen zur Steroidproduktion von Frühgeborenen größer 30 SSW beruhten bislang vor allem auf pharmakologischen Tests der HPAA [30, 61] oder auf Einzelmessungen des Plasmakortisolspiegels [46, 22, 78, 98] und stellten somit Momentaufnahmen dar. Ähnlich wie bei Erwachsenen erfolgt die Kortisolsekretion beim Frühgeborenen pulsatil - auch wenn noch kein echter zirkadianer Rhythmus besteht [4,54, 91]. Zwar ist die Schwankung des Kortisolspiegels gering [3], jedoch deuten die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien [78, 46, 22, 21] darauf hin, dass einzelne Messungen des Kortisols im Plasma nicht als integraler Parameter in Frage kommen, um die Funktion der Nebennierenrinde zu beurteilen. Diese Hypothese wird gestützt durch eine Studie von *Heckmann et al* [33] in der parallele Plasma- und Urinproben

bei Frühgeborenen untersucht wurden. Da sich keine Korrelation zwischen 24-Stunden-Glukokortikoidexkretionsraten und Plasmakortisoleinzelmessungen fand, lässt sich folgern, dass eine Plasmasteroideinzelmessung nicht die KPR repräsentiert.

Genauere Angaben über die adrenale Funktion sind daher möglich, wenn man die Sekretionsraten der Glukokortikoid-Metabolite und der fetalen Steroide im 24-Stunden-Urin bestimmt [102, 44].

Kraan et al [44] haben gezeigt, dass beim gesunden Erwachsenen die Summe der nicht invasiv bestimmten Glukokortikoidmetabolite in 24-Stunden-Urinproben 75% der invasiv mittels stabiler Isotope bestimmten KPR widerspiegeln.

Wie bereits im Kapitel „Patienten und Methoden“ erwähnt, stellten *Roberts* und *Lucas* [76] die fraktionierte Urinsammlung mit Hilfe von Einmalwindeln 1985 erstmals vor. Später wurde sie unter anderem von *Ahmad et al* [1] abgewandelt. Es konnte belegt werden, dass sich in Urinproben, die aus Einmalwindeln gewonnen werden, eine Reihe von Parametern zuverlässig bestimmen lassen.

Heckmann et al [32] weitete das Verfahren auf die Bestimmung von Glukokortikoid-Metaboliten und fetalen Steroiden aus: Der Urin wird in Zellulose-Windeln gesammelt und dann mit einer hydraulischen Presse zurück gewonnen. Anschließend werden die Glukokortikoid-Metabolite und die fetalen Steroide mittels Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS) und „ion selected monitoring“ identifiziert und quantifiziert. Die Rückgewinnungsrate für Glukokortikoide und fetale Steroide beträgt dabei mehr als 90%. Die Untersuchung zeigte, dass die 24-Stunden-Urinsammlung in Kombination mit der GC-MS eine nicht-invasive, nicht stressende und vertrauenswürdige Methode ist, um die Produktionsraten der Glukokortikoide und der fetalen Steroide zu beurteilen.

Die Methode hat einen weiteren Vorteil: In vielen der vorherigen Studien [46, 98, 78, 87] wurden die Steroidkonzentrationen mittels

Radioimmunassay (RIA) bestimmt. Bei dieser Methode können jedoch insbesondere bei Frühgeborenen Kreuzreaktionen auftreten, die das Ergebnis verfälschen [53]. Bei der Bestimmung mittels GC/MS treten diese störenden Phänomene nicht auf.

Die vorhandenen Referenzwerte [48] wurden, wie oben beschrieben, bisher mittels Plasmakortisol Einzelmessung bestimmt. Kritisch anzumerken ist, dass die meisten Studien keine Angaben über eine gesicherte Ruhephase vor der Entnahme machen. Diese Ruhephase ist jedoch sehr wichtig, da beispielsweise bei reifen Neugeborenen ein bis zu 11-facher Anstieg des Plasmakortisolspiegels 30 Minuten nach einer Nadelpunktion gezeigt werden konnte [50]. Um die Ruhephase zu sichern, haben wir in unserer Studie zahlreiche Kriterien festgelegt, die bei den Probanden 48 Stunden vor und nach der Sammelperiode erfüllt sein mussten (s. Kapitel „Patienten und Methoden“). Das Intervall von 48 Stunden wurde gewählt, da sich der Plasmakortisolspiegel reifer Neugeborener 48 Stunden nach einer Operation normalisiert hatte [63].

5.3. Die Kortisolproduktion von Frühgeborenen größer 30 SSW

5.3.1. Longitudinale Bestimmung der Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW als integraler Parameter der adrenalen Funktion

Die Kortisolproduktionsrate (KPR) der Probanden war in der ersten Lebenswoche zunächst konstant hoch. Dann fiel sie bis zur 4. Lebenswoche um die Hälfte ab. Korrigiert auf die renale Kreatininausscheidung betrug der Median am 1. Lebenstag 30 µg/kg/d, am 2. Lebenstag 26 µg/kg/d, am 3. Lebenstag 26 µg/kg/d, am 5. Lebenstag 20 µg/kg/d und in der 4. Lebenswoche 17 µg/kg/d.

Eine inverse Korrelation zwischen Plasmakortisolspiegel und postnatalem Alter beobachteten unter anderem auch *Wittekind et al* [98]. Sie wiesen bei Frühgeborenen mit einem mittleren Gestationsalter von 28 SSW einen Abfall des Plasmakortisolwerts von 216 auf 50 nmol/l in den ersten acht Lebenswochen nach.

Die insgesamt höhere KPR unserer Probanden während der ersten Lebenswoche könnte durch den Geburtstress einerseits und durch die im postnatalen Verlauf höchste Morbidität der ersten Lebenswoche bedingt sein. Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass Frühgeborene, die vaginal entbunden wurden, höhere Plasmakortisolwerte aufwiesen, als solche, die per Kaiserschnitt zur Welt kamen [84]. Aufgrund der hohen Sectio-Rate (95%) war in der vorliegenden Untersuchung eine Analyse gegen die Spontangeburt nicht möglich.

5.3.2. Einfluss der Schwere einer Erkrankung und der postnatalen Gewichtszunahme auf die Kortisolproduktionsraten bei Frühgeborenen größer 30 SSW

Im Gegensatz zu Frühgeborenen mit einem Gestationsalter kleiner 30 SSW [31], fand sich bei Frühgeborenen größer 30 SSW eine signifikant positive Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung (gemessen mittels SNAP) und der KPR – und dass obwohl die SNAP-Werte dieser Kinder (max. Median 5) viermal niedriger waren als die der Frühgeborenen kleiner 30 SSW (max. Median 22).

Dieses Ergebnis bestätigt vorherige Studien wie beispielsweise die von *Economou et al* [22]. Darin hatten Frühgeborene größer 30 SSW, die an einem Atemnotsyndrom litten, signifikant höhere Plasma-Kortisolwerte als die „gesunde“ Kontrollgruppe. Auch in der Studie von *Tamer et al* [87] an Frühgeborenen mit einem durchschnittlichen Gestationsalter von 32 SSW wiesen die Probanden mit einem Atemnotsyndrom signifikant höhere Serum-Kortisolkonzentrationen auf.

Lee et al [46] hingegen kamen zu einem anderen Ergebnis. In einer Untersuchung mit Frühgeborenen (mittleres Gestationsalter 32 SSW) konnten sie keinen Unterschied ermitteln zwischen den „gesunden“ Probanden und den Probanden, die aufgrund eines Atemnotsyndroms beatmet werden mussten. Sie stellten jedoch bei den kranken Kindern im Vergleich zu den „gesunden“ Kindern höhere Konzentrationen der Kortisolvorstufen fest. Daher vermuteten *Lee et al* [46], dass das Enzymsystem der Kortisolbiosynthese bei Frühgeborenen noch unreif ist und diese Kinder dementsprechend nicht adäquat auf Stress reagieren können. Bei dieser Studie ist jedoch kritisch anzumerken, dass erstens Kriterien für die Gruppeneinteilung „well/ill“ nicht eindeutig definiert wurden. Zweitens wurden die Proben mittels Radioimmunoassay analysiert, so dass die erhöhten Werte der Kortisolvorstufen auch auf kreuzreaktive Phänomene der Bestimmungsmethode zurückzuführen sein könnten.

Auch *Wittekind et al* [98] fanden keinen Unterschied zwischen „gesunden“ und kranken Frühgeborenen. In dieser Studie zeigte sich eine weite Streuung der Plasmakortisolwerte. Möglicherweise war die Fallzahl (n=25) zu klein, um signifikante Unterschiede feststellen zu können.

Scott et al [78] ermittelten initial signifikant niedrigere Plasma-Kortisolwerte bei Frühgeborenen mit Atemnotsyndrom und Surfactanttherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. In dieser Untersuchung, die drei verschiedenen Gestationsaltergruppen (1. 24-27 SSW, 2. 28-31 SSW, 3. 32-36 SSW) verglich, zeigten allerdings die unreifsten Kinder das größte Ausmaß einer adrenalen Insuffizienz bei Erkrankung. Die initial erniedrigten Kortisolwerte der kranken Frühgeborene von 34-36 SSW erreichten am Ende der ersten Lebenswoche zumindest das Niveau der Kontrollgruppe.

Das postnatale Wachstum hatte in der vorliegenden Studie keinen Effekt auf die KPR. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen der Studie an Frühgeborenen kleiner 30 SSW [31]. *Heckmann et al* beobachteten darin, dass die KPR der unreiferen Frühgeborenen sank, sobald die Kinder nach der postnatalen Phase an Gewicht zunahmen. Die Autoren schlossen daraus, dass Frühgeborene kleiner 30 SSW in der Lage sind die Synthese der katabolen Glukokortikoide während des Wachstums herunter zu regulieren. Vielleicht ist das Ausbleiben dieses Effektes bei Frühgeborenen größer 30 SSW darauf zurückzuführen, dass die KPR nur bis zum Zeitpunkt der Entlassung bestimmt wurde. Dieser lag bei den älteren Frühgeborenen 2-3 Monate früher als bei den unreiferen, so dass das größte Wachstum der reiferen Kinder nach der Entlassung erfolgte.

5.3.3. Die Kortisolproduktionsrate von Frühgeborenen größer 30 SSW im Vergleich zu Frühgeborenen kleiner 30 SSW

Dass Frühgeborene größer 30 SSW über eine reifere adrenale Stressantwort verfügen, lässt folgendes Ergebnis der vorliegenden Studie vermuten:

Im Vergleich zu Frühgeborenen kleiner 30 SSW mit dem gleichen postnatalen Alter [31], war die KPR unserer Probanden signifikant um das 1,5 bis 3fache niedriger. Dieses Ergebnis unterstützt vorhergehende Studien, die gezeigt haben, dass sich Gestationsalter und Plasma-Kortisolkonzentration entgegengesetzt verhalten [78, 35]: je jünger das Frühgeborene desto höher die Kortisolkonzentration.

Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte der KPR älterer Kinder [48] und Erwachsener [44], die in verschiedenen Studien invasiv durch Blutentnahmen bestimmt wurden. Die mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) aus dem Urin gewonnene KPR unserer Probanden entsprach knapp 30% dieser Werte. Zum Vergleich: bei unreiferen Frühgeborenen kleiner 30 SSW [31] waren es 70%.

Die hohen Kortisolproduktionsraten könnten darauf hindeuten, dass die adrenale Achse bei unreifen Frühgeborenen kleiner 30 SSW – die signifikant schwerer krank sind, als Frühgeborene größer 30 SSW – maximal aktiviert ist. Gehen wir jedoch davon aus, dass ältere Frühgeborene ihre Kortisolproduktion besser kontrollieren können, würde dies bedeuten, dass die erhöhten Werte bei den jüngeren Frühgeborenen nicht Ausdruck einer adäquaten Stressantwort sind, sondern sich dahinter ein unreifer Feedback-Mechanismus der Kortisolregulation verbirgt.

Tab. 9: Mittelwerte der Kortisolproduktionsrate (KPR) von Frühgeborenen über 30 SSW, älteren Kindern und Erwachsenen. Die letzteren wurden invasiv mittels stabiler Isotope bestimmt. Die mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie aus dem Urin gewonnene KPR der Frühgeborenen (FG) entspricht etwa 30% dieser Werte.

	KPR FG * [mg/m ² /d]	KPR Kinder [#] [85]	KPR Erwachsene [#] [49]
5. Tag	1,9 (1,2–2,8)		
2. Woche	1,8 (1,1–2,7)	6,8 ± 1,9	5,7 ± 1,6
3. Woche	1,7 (1,2–3,8)		
4. Woche	1,7 (1,2–2,4)		

*Median (Quartile), [#]Mittelwert ± SD, KPR: Kortisolproduktionsrate

Betrachtet man die höhere KPR der jüngeren Frühgeborenen als Ausdruck persistierender fetaler Mechanismen bzw. eines mangelnden Feedback-Mechanismus und damit als Zeichen der Unreife, könnte umgekehrt die niedrigere KPR bei den älteren Frühgeborenen darauf hinweisen, dass diese Kinder bereits über ein weiter entwickeltes Schutzsystem gegenüber den katabolen Effekten der Glukokortikoide verfügen.

Die Ergebnisse einer Studie von *Midgley et al* [57], in der Frühgeborene mit Nekrotisierender Enterokolitis die höchsten Plasmakortisolspiegel aufwiesen, bestätigen die Annahme, dass hohe Glukokortikoidkonzentrationen Frühgeborene gefährden.

In einer Untersuchung von *Heckmann et al* [31] hatten schwer kranke Frühgeborene kleiner 30 SSW mit hoher KPR ein erhöhtes Risiko eine intraventrikuläre Hämorrhagie zu entwickeln. Schwer kranke Frühgeborene mit niedriger KPR überlebten hingegen häufiger ohne solch eine Komplikation.

Für diese Hypothese spricht auch eine Beobachtung an reifen Neugeborenen. So zeigen diese in den ersten beiden Lebenswochen eine verminderte adrenale Stressreaktivität: *Boix-Ochoa et al* [11] wiesen nach, dass reife Neugeborene mit einem Lebensalter unter neun Tagen während einer Operationsphase signifikant niedrigere Plasma-Kortisolspiegel hatten, als solche, die älter als neun Tage waren.

Eine andere Erklärung für die im Vergleich höhere KPR der Frühgeborenen kleiner 30 SSW könnte sein, dass deren Gewebssensitivität gegenüber Kortisol herabgesetzt ist. Demnach benötigten sehr unreife Frühgeborene höhere Kortisolkonzentrationen um den gleichen Effekt zu erzielen. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits in einem anderen endokrinen System beobachtet: Eine Studie von *Mitanezh-Mokhtari et al* [58] konnte zeigen, dass hyperglykämie Frühgeborene kleiner 30 SSW im Vergleich zu reifen Neugeborenen höhere Insulinkonzentrationen benötigen, um den Blutzucker zu normalisieren.

5.3.4. Klinische Bedeutung der niedrigen Kortisolproduktionsraten von Frühgeborenen größer 30 SSW

In der vorliegenden Studie reagierten Frühgeborene größer 30 SSW auf Erkrankung mit einem Anstieg der KPR. Bei den älteren Kindern scheint die Entwicklung der Nebennierenrinde dementsprechend weiter fortgeschritten zu sein. Dies könnte mit der schrittweisen Reifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPAA) während des dritten Trimenons zusammenhängen, die auch *Mesiano* und *Jaffe* [40, 53] in einer Untersuchung an Primaten beschrieben haben.

Dementsprechend stellt sich die Frage welche Relevanz die Ergebnisse der vorliegenden Studie für die Praxis haben.

Glukokortikoide sind immens wichtig für die Reifung von Organsystemen wie beispielsweise der Lunge und für die Regulation des Immunsystems

während Erkrankung. Neonatologen diskutieren daher seit längerem, ob Frühgeborene während krankheitsbedingtem Stress von einer unterstützenden Therapie mit Glukokortikoiden profitieren würden.

Bei der Beantwortung dieser Frage muss man bedenken, dass hohe Kortisolspiegel den unreifen Organismus von Frühgeborenen schädigen können. *Challis et al* [18] zeigten, dass Feten, deren Mütter in der späten Schwangerschaft mit Glukokortikoiden behandelt wurden, einerseits wachstumsretardiert waren und zudem postnatal eine veränderte Funktion der HPAA sowie eine Insulinresistenz (im Sinne eines Typ 2 Diabetes) aufwiesen.

Dass hohe endogene Glukokortikoidspiegel das Frühgeborene schädigen können, haben verschiedene Untersuchungen bereits vermutet: *Heckmann et al* [31] fanden bei schwer kranken Frühgeborenen kleiner 30 SSW mit hohen Kortisolwerten vermehrt intraventrikuläre Hämorrhagien. Und bei *Midgley et al* [57] wiesen Frühgeborene mit Nekrotisierender Enterokolitis die höchsten Plasmakortisolspiegel auf.

Bis Ende der 1990er wurde Dexamethason bei Frühgeborenen nahezu routinemäßig angewandt, um chronischen Lungenerkrankungen vorzubeugen bzw. diese zu behandeln. Verschiedene Untersuchungen deckten jedoch akute Nebenwirkungen der postnatalen Therapie mit Dexamethason auf wie Hyperglykämie, art. Hypertonie oder nosokomiale Infektionen [65, 86].

Gravierender waren jedoch die beobachteten Langzeiteffekte: *Barrington et al* [8] zeigten in einer Metaanalyse, dass Frühgeborene nach einer postnatalen Dexamethasontherapie ein erhöhtes Risiko für eine Zerebralparalyse und psychomotorische Dysfunktion hatten. *Short et al* [82] beschrieben die geistige Entwicklung bei Kindern, die acht Jahre zuvor wegen einer Bronchopulmonalen Dysplasie mit Dexamethason behandelt worden waren. Die Probanden wiesen signifikant niedrigere IQ-Werte auf als die nicht-behandelte Kontrollgruppe. Andere Studien wiesen

nach, dass die postnatale Behandlung mit Dexamethason zu einer Reduktion der grauen Substanz des ZNS [60] und zu einem vermehrten Auftreten von Leukomalazien [92] führt.

Eine Alternative zu Dexamethason könnte Hydrokortison sein. Verschiedene Untersuchungen konnten bislang keine negativen Langzeiteffekte bezüglich des neurologischen Outcomes von Frühgeborenen feststellen, die während der Neonatalperiode mit Hydrokortison behandelt wurden [43, 49, 67]. Jedoch traten in zwei Studien, in denen Frühgeborene zur Prävention einer bronchopulmonalen Dysplasie eine Kombinationstherapie aus niedrig dosiertem Hydrokortison und Indometacin erhielten, gehäuft Darmperforationen auf [37, 130].

Wenn wir annehmen, dass Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 30 und 36 SSW über eine gereifte adrenale Stressantwort verfügen, bedeutet dies für die Praxis, dass man die Behandlung dieser Kinder mit Glukokortikoiden (vorzugsweise Hydrokortison) angesichts der zahlreichen Nebenwirkungen äußerst restriktiv handhaben sollte. In der Neonatologie findet Hydrokortison Anwendung in der Behandlung des katecholamin-refraktären Kreislaufschocks [2], Langzeit-untersuchungen liegen dazu keine vor.

Tab. 10: Studien über die Kortisolproduktionsraten (KPR) von Frühgeborenen

Studie	Gestations- alter (SSW), Probanden (n)	Unter- suchungs- zeitraum	Proben- material, Methode	Kriterien für Erkrankung	Kontrollgruppe	Kortisolwerte kranker (KF) und wenig beeinträchtigter (GF) FG ($\mu\text{g/dl}$, Ausnahme Zeile 5 u. 7)	Vergleich KPR well/ill
Lee 1989 [46]	32,7 (31–35) [#] , 22	2.–5. Tag	Plasma, RIA	moderate oder schwere Lungenerkrankung mit mechanischer Beatmung	„gesunde“ FG	GF: $6,0 \pm 0,9^{\#}$ KF: $6,9 \pm 1,0$	NS
Wittekind 1993 [98]	28 (24–33) [#] , 25	1–8 Wochen	Plasma, RIA	$\text{FiO}_2 > 0,25$ oder intravenöse Flüssigkeitstherapie oder Beatmung	„gesunde“ FG	GF: $3,6 (2,5–4,7)^*$ KF: $8,6 (5,7–13,4)^*$ i. 1. Lebenswoche [§]	NS (< 5 Lebens- wochen)
Economou 1993 [22]	$32 \pm 1,2^{\#}$, 60	1.–30. Tag	Plasma, PIA	Atemnotsyndrom	„gesunde“ FG	GF: $1,9 \pm 0,2^{\#}$ KF: $2,8 \pm 0,4$ am 3. LT um 8.00 Uhr [§]	ill sign. höher als well
Scott 1995 [78]	24–35, 120	2., 4., 6. Tag	Plasma, RIA	hoher RAS, Bedürftigkeit von Surfactant oder inotropen Substanzen	niedriger RAS, keine Therapie mit Surfactant oder inotropen Substanzen	GF: $5,9 \pm 0,36^{\#}$ KF: $3,9 \pm 0,36$ (Surfactant)	ill sign. niedriger als well
Heckmann 2005 [31]	$27,6 \pm 1,7^{\#}$, 61	1. Tag – 2. Mo.	Urin, GC/MS	ANS mit Surfactanttherapie, konnatale oder nosokomiale Infektion, IVH > II° – objektiviert durch SNAP	„gesunde“ FG	GF: $41 \mu\text{g/kg/d/mgcrea}$ KF: $47 \mu\text{g/kg/d/mgcrea}$ Median am 5. LT [§]	NS
Tamer 2006 [87]	31–36, 79	1. u. 3. Tag	Plasma, RIA	FG mit moderater Lungen- erkrankung (II), FG mit schwerer Lungenerkrankung mit mechanischer Beatmung und/oder Surfactanttherapie	FG ohne Lungenerkrankung	GF: $22 \pm 7,2 (I)^{\#}$ KF: $40,4 \pm 10,5 (II)$ $50,8 \pm 16,8 (III)$	ill (III) sign. höher als I u. II
diese Studie	$33,4 (30–36,9)^{\#}$, 79	1. Tag – 2. Mo.	Urin, GC/MS	ANS mit Surfactanttherapie, konnatale oder nosokomiale Infektion, IVH – objektiviert durch SNAP	„gesunde“ FG	GF: $17 \mu\text{g/kg/d/mgcrea}$ KF: $28 \mu\text{g/kg/d/mgcrea}$ Median am 5. LT [§]	sign. pos. Korrelation zw. SNAP u. Kortisolproduktion

[#] Mittelwert (Minimum–Maximum), ^{##} Mittelwert \pm Standardabweichung, * Median (Quartile), [§] Kortisolbestimmung erfolgte zu mehreren Zeitpunkten – angegeben wird je eine repräsentative Messung, RIA: Radio-Immunoassay, PIA: Polarized Immunofluorescence Assay, GC/MS: Gaschromatografie/Massenspektrometrie, SSW: Schwangerschaftswochen, RAS: Respiratory Acuity Score, ANS: Atemnotsyndrom, IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie, SNAP: Score for Neonatal Acute Physiology, FG: Frühgeborene, NS: nicht signifikant

5.4. Die Fetalzonensteroiden von Frühgeborenen größer 30 SSW

Bezogen auf die Gesamt-Steroidexkretionsrate hatten die fetalen Steroide bei Frühgeborenen größer 30 SSW bis zu einem postnatalen Alter von zwei Monaten einen Anteil von mehr als 90%. Die Mediane der Produktionsraten der 3- β -Hydroxy-5-en-steroiden im Urin ($\mu\text{g/kg/d}$) betrugen bei diesen Kindern an Tag 1: 1836, an Tag 2: 2180, an Tag 3: 2974, an Tag 5: 3351, in Woche 2: 3332, in Woche 3: 2979, in Woche 4: 2386 und im 2. Monate: 2851.

Verglichen mit unreiferen Frühgeborenen kleiner 30 SSW [34] produzierten unsere Probanden signifikant weniger fetale Steroide, im Vergleich zu reifen Neugeborenen [99] hingegen signifikant mehr. Erst kurz vor dem Erreichen des eigentlichen Geburtstermins, im postmenstruellen Alter von 38 SSW, sanken die Exkretionsraten der 3- β -Hydroxy-5-en-steroiden im Urin der Frühgeborenen größer 30 SSW auf das Niveau reifer Neugeborener ab.

Da die Konzentration von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) im Plasma sowohl von dessen Synthese- als auch Freisetzungsraten abhängt, unterliegt sie großen Schwankungen. Die Bestimmung der Ausscheidungsrate der 3- β -Hydroxy-5-en-steroiden mit dem Urin scheint daher als Parameter für die Aktivität der fetalen Zone besser geeignet zu sein [55]. Bisher wurden die Exkretionsraten der fetalen Steroide longitudinal nur bei Frühgeborenen kleiner 30 SSW ermittelt [55, 34]. Untersuchungen dieser Art bei Frühgeborenen größer 30 SSW sind unseres Wissens bis jetzt noch nicht durchgeführt worden.

Die beobachteten anhaltend hohen Exkretionsraten fetaler Steroide und das Abfallen der Werte im postmenstruellen Alter von etwa 38 SSW lassen vermuten, dass die Involution der Fetalzone der Nebennierenrinde nicht vom Zeitpunkt der Geburt bestimmt wird, sondern vom Gestationsalter.

Bei reifen Neugeborenen nehmen die DHEAS-Konzentration im Plasma und die Ausscheidung der 3- β -Hydroxy-5-en-steroides mit dem Urin nach der Geburt innerhalb weniger Wochen ab [80, 20]. Die Involution der Fetalzone beginnt bei ihnen direkt nach der Geburt. Gesteuert wird dieser Prozess unter anderem durch Aktivin A und einen transformierenden Wachstumsfaktor (TGF β) [85]. Im Alter von einem Jahr ist er abgeschlossen – die Fötalzone der Nebennierenschale ist dann verschwunden.

Im Gegensatz dazu haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Spiegel der fetalen Steroide bei Frühgeborenen bis zum Erreichen eines Gestationsalters von 40 SSW – also des eigentlichen Geburtstermins – erhöht bleiben [24, 29, 70, 71, 56]. Auch *Midgley et al* [56] beobachteten bei Frühgeborenen kleiner 30 SSW, dass die 3- β -Hydroxy-5-en-steroides in Abhängigkeit vom Gestationsalter abfielen. Sie schlussfolgerten daraus, dass die Involution der Fetalzone und demzufolge die Aktivität des Enzyms 3- β -Hydroxy-Steroiddehydrogenase nicht nur durch die Östrogene der Plazenta [14], sondern vor allem genetisch gesteuert sein könnten.

Betrachtet man Abbildung 7 (Ergebnisteil: S. 37), so fällt auf, dass die Frühgeborenen kleiner 30 SSW die Werte reifer Neugeborener erst im Alter von 40 SSW erreichen, Frühgeborene größer 30 SSW hingegen schon zwei Wochen früher (in der 38. SSW). Die Involution scheint bei den unreiferen Kindern langsamer zu verlaufen, was durch das noch unreifere Enzymsystem bedingt sein könnte. Der Unterschied könnte jedoch auch durch die Streuung der Messwerte erklärt werden.

Welche physiologische und klinische Rolle die postnatal anhaltend hohen Dehydroepiandrosteron-Spiegel bei Frühgeborenen spielen, ist unklar. Denkbar ist, dass fetale Steroide verschiedene Organsysteme beeinflussen können.

In der vorliegenden Studie unterschied sich die Produktionsrate fetaler Steroide (FPR) von männlichen und weiblichen Frühgeborenen größer 30 SSW nicht signifikant. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Schwere von Erkrankungen (gemessen anhand des SNAP) und der FPR gefunden werden. In-vitro-Studien haben jedoch gezeigt, dass Dehydroepiandrosteron-Sulfat die Surfactant-Synthese negativ beeinflusst [89]. *Heckman et al* [34] beobachteten in einer Studie mit Frühgeborenen kleiner 30 SSW, dass die Exkretionsrate der fetalen Steroide der männlichen Frühgeborene in den ersten vier Lebenswochen zweimal höher war als die der weiblichen. Gleichzeitig litten die männlichen Frühgeborenen häufiger an Atemnotsyndromen, außerdem war ihre Morbidität und Mortalität im Vergleich zu den weiblichen Probanden größer. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen hohen Dehydroepiandrosteron-Konzentrationen und dem Auftreten von Atemnotsyndromen ermittelten *Heckmann et al* in ihrer Studie nicht. Sie führten dies auf die niedrige Inzidenz von Lungenerkrankungen innerhalb der Studienpopulation zurück.

Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Dehydroepiandrosteron einen anti-glukokortikoiden Effekt hat [52], es mit dem Immunsystem interagiert [77, 68] und wahrscheinlich auch im Alterungsprozess [69] und bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielt [7]. Die große Bandbreite möglicher Effekte der fetalen Steroide und deren Bedeutung für Frühgeborene machen weitere Studien notwendig.

5.5. Die Regulation der Nebennierenrinde beim Feten und Frühgeborenen

Welche Faktoren steuern die Aktivität der Nebennierenrinde? In der vorliegenden Studie wurde dieser Aspekt untersucht, indem die Ausscheidungsraten der fetalen Steroide und der Glukokortikoide simultan beobachtet wurden. Bis zum zweiten Lebensmonat war bei

Frühgeborenen größer 30 SSW keine Dissoziation zwischen den fetalen Steroiden und den Glukokortikoiden erkennbar. *Heckmann et al* [34] konnten bei Frühgeborenen kleiner 30 SSW ebenfalls keine Dissoziation vor Vollendung des 2. Lebensmonats feststellen.

In akuten Stresssituationen (z. B. art. Hypotension) schüttet der fetale Hypothalamus Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) aus, das die Hypophyse zur Produktion von ACTH anregt. ACTH wiederum reguliert das Wachstum und die Aktivität der Nebennierenrinde [25, 28, 101]. Das belegen auch Ergebnisse aus Tierversuchen: So atrophierte die Nebennierenrinde von Hasen- und Ratten-Feten, wenn man diesen die Hypophyse entfernte [41, 42]. Und auch in menschlichen Feten mit Anencephalus konnte eine Atrophie der fetalen Zone der Nebennierenrinde festgestellt werden [28, 101]. Darüber hinaus bestätigten In-vitro-Studien mit fetalem Nebennierenrindengewebe [25] und In-vivo-Untersuchungen an Frühgeborenen [95], dass ACTH die Produktion sowohl der Glukokortikoide als auch fetalen Steroide stimuliert.

Im Gegensatz dazu fanden verschiedene Studien der letzten Jahre Hinweise darauf, dass eine Dissoziation zwischen der Ausscheidung der fetalen Androgene und Glukokortikoide besteht [55, 38]. Dementsprechend könnte ACTH nicht das einzige Hormon sein, dass die Fötalzone der Nebennierenrinde beeinflusst. *Midgley et al* [55] konnten in einer Untersuchung an Frühgeborenen keinen Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration von ACTH und Dehydroepiandrosteron-Sulfat oder der Urinexkretionsrate der 3- β -Hydroxy-5-en-steroiden feststellen. Sie beobachteten, dass exogen zugeführte Steroide bei den Frühgeborenen zwar eine Suppression von ACTH und Kortisol im Plasma bewirken, Plasma- Dehydroepiandrosteron-Sulfat und 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide im Urin jedoch nicht beeinflusst werden. Versuche an Rhesus-Affen [79] kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

Unterstützt wird die These der Dissoziation auch durch folgendes Ergebnis der vorliegenden Studie: So reagierten Frühgeborene größer 30 SSW auf Erkrankungen (Schwere bestimmt durch SNAP) mit einem Anstieg der Kortisolproduktionsrate, die Produktionsrate der fetalen Steroide änderte sich aber nicht. Dementsprechend müsste es neben ACTH weitere Faktoren geben, die Einfluss auf die Fetalzone nehmen. Welche dies sein könnten ist noch unklar. Diesbezüglich wären weitere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum nach der Entlassung notwendig, in denen mögliche Kandidaten für die regulierenden Faktoren parallel im Plasma bestimmt würden.

5.6. Limitationen der Studie und Ausblick in die Zukunft

In dieser Studie wurden erstmalig und nicht-invasiv die KPR als integraler Parameter der adrenalen Funktion bei einer großen Zahl Frühgeborener größer 30 SSW bestimmt. Dabei fand sich eine positive Korrelation zwischen Krankheitsstress und KPR. Die weite Streuung der Messwerte erlaubte jedoch nicht, einen Faktor zu bestimmen, um den die KPR abhängig vom Anstieg des SNAP anstieg. Als weitere Erklärung dafür kann auch der im Vergleich zu den sehr unreifen Frühgeborenen deutlich geringere Krankheitsstress im untersuchten Kollektiv angeführt werden.

Verglichen mit Frühgeborenen kleiner 30 SSW waren die Kortisolproduktionsraten der Probanden dieser Studie signifikant niedriger. Dies erklärt sich jedoch nicht durch eine unvollständigere Sammlung des Urins bei den reiferen und damit bewegungsaktiveren Kindern, da die ausgeschiedenen Kreatininmengen im Referenzbereich lagen. Diese Beobachtung könnte ein Zeichen der gereiften adrenalen Funktion sein.

Der nicht-invasive Ansatz der vorliegenden Untersuchung erlaubte nicht, adrenocorticotrope Faktoren parallel im Blut zu untersuchen, so dass über die Regulation der Nebennierenrinde nur indirekte Schlüsse möglich sind.

Auch kann anhand dieser Studie keine Aussage darüber getroffen werden, ob kranke Frühgeborene größer 30 SSW mit niedriger KPR mit Hydrokortison substituiert werden sollten. Die Messgeschwindigkeit ist aktuell noch zu langsam, um eine Notfalldiagnostik einer relativen adrenalen Insuffizienz durchzuführen.

Niedrigere KPR können bei Frühgeborenen auch als Ausdruck eines Schutzmechanismus vor den katabolen Effekten des Hormons interpretiert werden. Welche Folgen hohe Glukokortikoidkonzentrationen bei Frühgeborenen größer 30 SSW haben ist unklar. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zu Erkrankungen im Erwachsenenalter (z. B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II, Depressionen etc.) bestehen könnte [72, 88]. Zukünftige Forschungsschwerpunkte zur adrenalen Funktion Neu- und Frühgeborener müssen daher die somatische und psychomotorische Langzeitentwicklung der Kinder beachten und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Einfluss einer prä- und postnatalen Wachstumsretardierung auf die Funktion der HPNA und Korrelation zum Langzeitoutcome.
- 2) Kurz- und Langzeiteffekte einer Hydrocortisonsubstitution bei Frühgeborenen.
- 3) Effekte von Stress auf die Kortisolproduktion und Korrelation zum Wachstum im Langzeitverlauf.
- 4) Häufigkeit und Folgen einer relativen adrenalen Insuffizienz bei reifen Neugeborenen – Untersuchungen mittels GC-MS liegen bisher nicht vor.

6. Zusammenfassung

Ziel der Studie: Die Datenlage über die Funktion der Nebennierenrinde von Frühgeborenen (FG) größer 30 Schwangerschaftswochen (SSW) ist spärlich und zum Teil widersprüchlich. Das Ziel der Studie bestand darin, die Kortisolproduktionsrate (KPR) als einen integralen Parameter der adrenalen Funktion dieser Kinder während der Neonatalperiode und den Einfluss der Schwere von Erkrankung auf die Höhe der KPR zu bestimmen. Weiterhin sollten die Ergebnisse mit denen unreifer FG kleiner 30 SSW verglichen werden. Zusätzlich sollte die Produktionsrate der fetalen Steroide (FPR) longitudinal bestimmt werden, um Aussagen über den gestationsalterabhängigen zeitlichen Verlauf der Involution der Fötalzone treffen zu können. Untersucht wurde auch, ob die Produktion der Glukokortikoide und fetalen Steroide den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen.

Methodik: Longitudinale Beobachtungsstudie. Urin wurde nicht-invasiv in Windeln aus reiner Zellulose 24 Stunden lang gesammelt und durch eine hydraulische Presse (120kPa/cm²) extrahiert. Glukokortikoide bzw. fetale Steroide wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. Die KPR bzw. FPR wurde aus der Summe der individuellen Metabolite berechnet (Summe aus 14 bzw. 17 Metaboliten) und bei 59 „wenig beeinträchtigten“ (Mittelwert [Standardabweichung] : 33,5 [3,5] SSW) und 20 „kranken“ (Mittelwert [Standardabweichung]: 33,3 [3,3] SSW) FG bestimmt. Eine postnatale Steroidtherapie war ein Ausschlusskriterium. Die Schwere der Erkrankung wurde nach klinischen Kriterien und dem „Score for Neonatal Acute Physiology“ (SNAP) beurteilt.

Ergebnisse: Die höchsten SNAP-Werte wurden in der ersten Lebenswoche gemessen und unterschieden sich zwischen kranken und wenig beeinträchtigten FG bis auf Tag 2 ($p=0,06$) signifikant ($p\leq 0,01$). Die Mediane der KPR ($\mu\text{g/kg/d/mg}$ Kreatinin) betrugen bei kranken (wenig beeinträchtigten) FG an Tag 1: 31 (28); Tag 2: 24 (28); an Tag 3:

27 (26); Tag 5: 28 (17); Woche 2: 20 (19); Woche 3: 17 (19); Woche 4: 16 (16) und Monat 2: 17 (23). Die univariate Analyse ergab eine signifikante Korrelation zwischen maximalem SNAP und dem Maximum der KPR (odds ratio 3,7 (95% confidence interval 1,2-11,5); $p = 0,02$). Auch nach Hinzunahme weiterer Einflussfaktoren wie des Gestationsalters ($p=0,004$), Geburtsmodus (nicht signifikant, NS), Geschlecht (NS) und pränataler Steroidtherapie (NS) in eine logistische Regressionsanalyse blieb der Einfluss des max. SNAP auf die max. KPR signifikant. Im Vergleich zu unreiferen FG kleiner 30 SSW waren die KPR der FG größer 30 SSW in der Neonatalperiode signifikant um den Faktor 1,5 bis 3,0 niedriger [31]. Die FPR von FG größer 30 SSW näherte sich ab einem postmenstruellen Alter von 38 Wochen den Werten der reifen Neugeborenen an. In einer Spearman-Rang-Analyse konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Ausscheidungsraten der fetalen Steroide und der Glukokortikoidmetabolite gefunden werden.

Diskussion: Bei FG größer 30 SSW besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Kortisolproduktion. Dies deutet auf eine Reifung der adrenalen Stressantwort im Vergleich zu unreifen FG mit einem Gestationsalter unter 30 SSW hin. Dieser Reifungsprozess ist gleichzeitig mit einer signifikant niedrigeren Kortisolproduktion verglichen mit FG kleiner 30 SSW assoziiert. Die Involution der Fötalzone ist nicht abhängig vom Geburtszeitpunkt sondern vom postmenstruellen Alter. Die Produktion der fetalen Steroide und der Glukokortikoide scheint unabhängig von einander reguliert zu werden.

7. Summary

Context: Research on the adrenal stress response of more mature preterm infants between 30 and 36 weeks is rare and inconsistent. One object of this study was to investigate urinary excretion rates of glucocorticoid metabolites (GM) in well and ill preterm infants (PI) > 30 wks and to compare them to those of more immature PI < 30 wks. Another aim was to investigate the urinary excretion rates of fetal zone steroids (FM) to obtain information on the involution of the adrenal foetal zone. At least, however, this paper contributes to debate whether cortisol and fetal zone steroid production are regulated in the same way.

Patients and Methods: Longitudinal observational study. GM and FM were profiled by gas chromatography-mass spectrometry in 24-h urinary samples. Excretion rates of single GM and FM were summed to calculate cortisol production rates (CPR) and foetal zone steroid production rates (FPR) respectively in 59 well (mean [SD]: 33,5 [3,5] SSW) and 20 ill (mean [SD]: 33,3 [3,3] SSW) PI. One criterion for exclusion was a postnatal steroid therapy. Illness severity was measured by the score of neonatal acute physiology (SNAP).

Results: During the 1st week of life, SNAP were significantly higher in the group of ill PI ($p < 0,01$) compared to well PI except day 2 ($p = 0,06$). Medians of CPR ($\mu\text{g/kg/d/per mg creatinine}$) in ill (well) PI were at 1st day: 31 (28); 2nd day: 24 (28); 3rd day: 27 (26); 5th day: 28 (17); 2nd week: 20 (19); 3rd week: 17 (19); 4th week: 16 (16) and 2nd month: 17 (23). There was a significant correlation between the maximum of SNAP and the maximum of CPR (odds ratio 3,7 (95% confidence interval 1,2-11,5); $p = 0,02$) in a regression model which comprised gestational age ($p = 0,004$), mode of delivery (not significant, NS), gender (NS) and the administration of prenatal steroids (NS) as co-variables. The CPR of PI >30wks were 1.5-3 times lower compared to PI <30wks [31].

The FPR of PI > 30 SSW approached those of term neonates at a postmenstrual age of 38wks. Moreover, there was no significant correlation between the excretion rates of the GM and the FM.

Conclusions: In contrast to PI <30wks, there was a positive correlation between the severity of illness and CPR in PI >30wks, indicating a maturation of the adrenal stress response. This maturation was concurrently associated with significantly lower CPR compared to PI <30wks. The involution of the fetal zone is related to gestation rather than birth. CPR and FPR seem to be regulated differentially.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahmad T, Vickers D, Campbell S, Coulthard MG, Pedler S. Urine collection from disposable nappies. *Lancet* 1991; 338 (Sept 14): 674–677.
2. American Academy of Pediatrics. Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants. *Pediatrics* 2002; 109:330-338.
3. Antonini SR, u. Mitarb. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 423–426.
4. Arnold JD, u. Mitarb. Antenatal glucocorticoids modulate the amplitude of pulsatile cortisol secretion in premature neonates. *Pediatr. Res.* 1998; 4: 876–881.
5. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers–Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119 (3): 417–23.
6. Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J. Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 1979; 95 (5 Pt2): 819–23.
7. Barrett-Connor E, et al. A prospective study of DHEAS, mortality and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 1519-1524.
8. Barrington KJ. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr.* 2001;1: 1.
9. Beitins IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res* 1973; 7: 509–519.
10. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal Necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978; 187 (1): 1–7.

11. Boix-Ochoa J, u. Mitarb. Cortisol response to surgical stress in neonates. *Pediatr Surg Int* 1987; 2: 267–270.
12. Breckwoldt M, Keck C. Dehydroepiandrosteron – Physiologie, Metabolismus, klinische Bedeutung. *Geburtsh Frauenheilk* 2002; 62:738–742.
13. British Association of Perinatal Medicine and the Research Unit of the Royal College of Physicians, Report of a Joint Working Group; Development of audit measures and guidelines for good practice in the management of neonatal respiratory distress syndrome. *Arch Dis Child* 1992; 67 (10 Spec No): 1221–7.
14. Byrne GC, u. Mitarb. Steroid inhibitory effects upon human adrenal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62(2): 413–8.
15. Carr BR, Simpson ER. Lipoprotein utilization and cholesterol synthesis by the human fetal adrenal gland. *Endocr Rev* 1981; 2: 306–318.
16. Caulfield MP, Lynn T, Gottschalk ME, Jones KL, Taylor NF, Malunowicz EM, Shackleton CH, Reitz RE, Fisher DA. The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3682–3690.
17. Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklov AC, Ceccatelli S, de Santiago A, Jacobson SH. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res* 1998; 44: 317–322.
18. Challis JR, u. Mitarb. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and postnatal health. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:135-144.
19. Coulter CL, u. Mitarb. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2

- (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology*. 1998; 139 (12): 5144–50.
20. de Peretti E, Forest MG. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 572–577.
21. Doerr HD, u. Mitarb. Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life. *Pediatr Res* 1988; 23: 525–529.
22. Economou G, u. Mitarb. Cortisol secretion in stressed babies during the neonatal period. *Horm Res* 1993; 40 (5–6):217–221.
23. Edwards HE, Burnham WM.. The Impact of Corticosteroids on the Developing Animal. *Pediatric Research*. 2001; 50(4): 433-440.
24. Forest MG, de Peretti E, Bertrand J. Testicular and adrenal androgens and their binding to plasma proteins in the perinatal period: developmental patterns of plasma testosterone, 4–androstenedione, dehydroepiandrosterone and its sulfate in premature and small for date infants as compared with that of full–term infants. *J Steroid Biochem* 1980; 12: 25–36.
25. Fujieda K, Faiman C, Reyes FI, Winter JS. The control of steroidogenesis by human fetal adrenal cells in tissue culture. I. Responses to adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 34–38.
26. Giedion A, Haefliger H, Dangel P. Acute pulmonary X–ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and positive end–expiratory pressure (PEP). *Pediatr Radiol* 1973; 1 (3): 145–52.
27. Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V. Fetal hypothalamic–pituitary–adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 104–109.

28. Gray ES, Abramovich DR. Morphologic features of the anencephalic adrenal gland in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 491–495.
29. Grueters A, Korth-Schutz S. Longitudinal study of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in preterm and fullterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 314–320.
30. Hanna CE, u. Mitarb. Hypothalamic pituitary adrenal function in the extremely low birth weight infant. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76(2): 384–7.
31. Heckmann M., u. Mitarb. Cortisol production rates in preterm infants in relation to growth and illness: a noninvasive prospective study using gas chromatography–mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10): 5737–42.
32. Heckmann M, u. Mitarb. Assessing cortisol production in preterm infants: do not dispose of the nappies. *Pediatr Res* 2005; 57(3): 412–8.
33. Heckmann M, Hartmann MF, Kampschulte B, Grofer B, Wudy SA. Plasmasteroideinzelmessungen repräsentieren nicht die Cortisolproduktionsraten (CPR) bei Frühgeborenen: Eine Studie mittels Gaschromatographie–Massenspektrometrie (GC–MS) (Abstract). *Z Geburtsh Neonatol* 2006;210:S31.
34. Heckmann M, u. Mitarb. Persistent high activity of the fetal adrenal cortex in preterm infants: Is there a clinical significance? *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 Nov;19(11):1303–12.
35. Heckmann, M, u. Mitarb. Reference range for serum cortisol in well preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;81(3):F171–4.
36. Heckmann M, Wudy SA, Haack D, Pohlandt F. Serum cortisol in ill preterm infants less than 30 weeks gestational age. *Acta Paediatr* 2000; 89: 1098–1103.

37. Heide-Jalving M, et al. Short- and long-term effects of neonatal glucocorticoid therapy: is hydrocortisone an alternative to dexamethasone? *Acta Paediatr* 2003; 92: 827-35.
38. Homoki J. Influence of maternal antenatal treatment with betamethasone on the postnatal adrenal status in preterm infants. In: Görög S, ed. *Proceedings of the 4th Symposium on the Analysis of Steroids*. Budapest: Academiai Kiado, 1990: 333–337.
39. Honour JW, Kent J, Shackleton CH. Improved recoveries in the extraction of steroids from neonatal urine. *Clin Chim Acta* 1983; 129:229–232.
40. Jaffe RB, u. Mitarb. The regulation and role of fetal adrenal development in human pregnancy. *Endocr Res*. 1998;24(3–4): 919–26. Review.
41. Jost A, Cohen A. Significance of the "atrophy" of the fetal adrenal glands of the rat induced by hypophysectomy (decapitation). *Dev Biol*. 1966; 14(1): 154–68.
42. Jost A, Jacquot R. The role of the pituitary, the adrenals and the placenta in the synthesis of glycogen by the liver in fetal rabbits and rats. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1958; 247(25): 2459–62.
43. Karemaker R, Heijnen CJ, Veen S, et al. Differences in behavioural outcome and motor developmental at school age after neonatal treatment for chronic lung disease with dexamethasone versus hydrocortisone. *Pediatr Res* 2006; 60:745-50.
44. Kraan GP, Dullaart RP, Pratt JJ, Wolthers BG, Drayer NM, De Bruin R. The daily cortisol production reinvestigated in healthy men. The serum and urinary cortisol production rates are not significantly different. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1247–1252.
45. Kutlzer MA, Ruane EK, Coksaygan T, Vincent SE, Nathanielsz PW. Effects of three courses of maternally administered dexamethasone at 0.7, 0.75 and 0.8 of gestation on prenatal and postnatal growth in sheep. *Pediatrics* 2004; 113: 313–319.

46. Lee MM, u. Mitarb. Serum adrenal steroid concentrations in premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 1133–1136.
47. Liggins GC. Adrenocortical-related maturational events in the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126(7): 931-41.
48. Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, Cassorla F. Cortisol production rate in childhood and adolescence. *J Pediatr* 1990; 117: 892–896.
49. Lodygensky GA, Rademaker K, Zimine S, et al. Structural and functional brain development after hydrocortisone treatment for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics* 2005; 116: 1-7.
50. Mantagos S, Koulouris A, Vagenakis A. A simple stress test for the evaluation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis during the first 6 months of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72 (1): 214–6.
51. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res* 2000; 47: 291–300.
52. May M, et al. Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life Sci* 1990; 46: 1627-1631.
53. Mesiano S, u. Mitarb. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997;18(3):378–403. Review.
54. Metzger DL, u. Mitarb. Characterization of pulsatile secretion and clearance of plasma cortisol in premature and term neonates using deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 458–463.
55. Midgley PC, Russell K, Oates N, Holownia P, Shaw JC, Honour JW. Adrenal function in preterm infants: ACTH may not be the sole regulator of the fetal zone. *Pediatr Res* 1998; 44: 887–893.
56. Midgley PC, Russell K, Oates N, Shaw JC, Honour JW. Activity of the adrenal fetal zone in preterm infants continues to term. *Endocr Res* 1996; 22: 729–733.

57. Midgley PC, u. Mitarb. Plasma cortisol, cortisone and urinary glucocorticoid metabolites in preterm infants. *Biol Neonate* 2001; 79(2):79–86.
58. Mitanchez-Mokhtari D, Lahlou N, Kieffer F, Magny JF, roger M, Voyer M. Both relative insuline resistance and defective islet beta-cell processing of proinsulin are responsible for transient hyperglycemia in extremely preterm infants. *Pediatrics* 2004; 113:537-541.
59. Munck A, u. Mitarb. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; 5: 25-44.
60. Murphy BP, u. Mitarb. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics*. 2001; 107(2): 217–21.
61. Ng PC, u. Mitarb.. The pituitary-adrenal responses to exogenous human corticotrophin-releasing hormone in preterm, very low birth weight infants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(3): 797–9.
62. Ng PC. The fetal and neonatal hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000;82(3):F250–4. Review.
63. Okur H, Kucukaydin M, Ustdal KM. The endocrine and metabolic response to surgical stress in neonate. *J Pediatr Surg* 1995; 30 (4): 626–5.
64. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1.500 gm. *J Pediatr* 1978; 92 (4):529–34.
65. Papile LA, u. Mitarb. A multicenter trial of two dexamethasone regiments in ventilator dependent premature infants. *N Engl J Med* 1998; 338: 1112–1118.
66. Pasqualini JR, Nguyen BL, Uhrich F, Wiqvist N, Diczfalusy E. Cortisol and cortisone metabolism in the human foeto–placental unit at midgestation. *J Steroid Biochem* 1970; 1: 209–219.

67. Rademaker KJ, et al. Neonatal hydrocortisone treatment: neurodevelopment outcome and MRI at school age in preterm-born children. *J Pediatr* 2007; 150: 351-7.
68. Regelson W, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) – the “mother steroid” i. Immunological action. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 553-563.
69. Regelson W, et al. Hormonal intervention: “buffer hormones” or “state dependency”. The role of DHEA, thyroid hormone, estrogen and pophysectomy in aging. *Ann NY Acad Sci* 1988; 521: 260-271.
70. Reynolds JW. Excretion of 16- α -hydroxysteroids by premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1966; 26: 1251–1256.
71. Reynolds RM, et al. Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight an cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 245-50.
72. Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman–Daniels K, Goldmann DA. Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics* 1993; 91 (3): 617–23.
73. Richardson DK, Phibbs CS, Gray JE, McCormick MC, Workman–Daniels K, Goldmann DA. Birth weight and illness severity: independent predictors of neonatal mortality. *Pediatrics* 1993; 91 (5): 969–75.
74. Ridings PC, Bloomfield GL, Blocher CR, Sugerman HJ. Cardiopulmonary effects of raised intra–abdominal pressure before and after intravascular volume expansion. *J Trauma* 1995; 39 (6): 1071–5.
75. Roberts SB, Lucas A. Measurement of urinary constituents and output using disposable napkins. *Arch Dis Child* 1985; 60:1021–1024.
76. Rook GAW, et al. Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of Th1/Th2 balance. *Immunol Today* 1994; 14: 301-303.

77. Scott SM, Watterbert KL. Effect of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. *Pediatr Res* 1995; 37 (1): 112–6.
78. Seron-Ferre M, Jaffe RB, Rich BH, Rosenfield RL, Lucky AW, Helke JC, Otto P, Parker LN, Odell WD. The fetal adrenal gland. Adrenarche: changing adrenal response to adrenocorticotropin. Evidence for existence of cortical androgen-stimulating hormone. *Annu Rev Physiol* 1981; 43:141–162.
79. Shackleton CH, Gustafsson JA, Mitchell FL. Steroids in newborns and infants. The changing pattern of urinary steroid excretion during infancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1973; 74: 157–167.
80. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 1988; 82 (4): 527–32.
81. Short EJ, u. Mitarb.. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics*. 2003; 112(5): e359.
82. Siiteri PK, MacDonald PC. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1966; 26: 751–761.
83. Smith JD, et al. Fetal plasma steroids in relation to parturition. The effect of gestational age upon umbilical plasma corticosteroids following hysterotomy and cesarean section. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1974; 81:16
84. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1110–1115.
85. Stark AR, u. Mitarb. Adverse effects of early dexamethasone in extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health

- and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med*. 2001; 344(2): 95–101.
86. Tamer G., u. Mitarb. Evaluation of serum cortisol levels in a relatively large and mature group of ventilated and nonventilated preterm infants with respiratory distress syndrome. *Am J Perinatol*. 2006;23(6):335–9.
87. Thompson C, et al. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* 2001; 179: 450-5.
88. Torday JS. Androgens delay human fetal lung maturation in vitro. *Endocrinology* 1990; 126: 3240–3244.
89. Veith J, Scharre JE. Retinopathy of prematurity – review of the pathophysiology and classification. *J Am Optom Assoc* 1992; 63 (7): 469–9.
90. Vermes I, u. Mitarb. Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants. *Hormon Res* 1982; 12: 237–244.
91. Vermont Oxford Network Steroid Study Group. Early postnatal dexamethasone therapy for the prevention of chronic lung disease. *Pediatrics*. 2001; 108(3): 741–8.
92. Voigt M, Schneider KT, Jahring K. [Analysis of a 1992 birth sample in Germany. 1: New percentile values of the body weight of newborn infants]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1996; 56(10): 550–8.
93. Volpe JJ. *Neurology of the Newborn*. Philadelphia: WB Saunders 1995: 314–369.
94. Wallace AM, u. Mitarb. Adrenal status during the first month of life in mature and premature human infants. *J Endocrinol*. 1987;112 3):473–80.
95. Wilkins BH. Renal function in sick very low birthweight infants: 2. Urea and creatinine excretion. *Arch Dis Child* 1992; 67: 1146–1153.

96. Winder SDW. Fetal and neonatal adrenocortical physiology. In: Polin RA, Fox WW (Hrsg.). Fetal and neonatal physiology, 2. Aufl., WB Saunders, Philadelphia 1998.
97. Wittekind CA, u. Mitarb. Longitudinal study of plasma ACTH and cortisol in very low birth weight infants in the first 8 weeks of life. *Early Hum Dev.* 1993; 33(3):191–200.
98. Wudy SA, Homoki J, Teller WM. Clinical steroid analysis by gas chromatography–mass spectrometry. In: Niessen W.M.A. (Hrsg.), *Current practice of gas chromatography – mass spectrometry*, Marcel Dekker, Inc. New York, Base 2001: 309–339.
99. Wudy SA, Homoki J, Teller WM. Clinical steroid analysis by gaschromatography- mass spectrometry. Niessen WMA, ed. *Current Practice of Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. New York – Basel: Marcel Dekker, Inc, 2001; 309-339.
100. Young MC, Laurence KM, Hughes IA. Relationship between fetal adrenal morphology and anterior pituitary function. *Horm Res* 1989; 32:130–135.
101. Zumoff B, Fukushima DK, Hellmann L. Intercomparison of four methods for measuring cortisol production. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38:169–175.

9. Anhang

9.1. Abstract (eingereicht zur Publikation in „Neonatology“)

Maturation of adrenal function determined by urinary glucocorticoid steroid excretion rates in preterm infants of more than 30 weeks gestational age

Bianka Grofer¹, Rolf-Hasso Bödeker², Ludwig Gortner³, Matthias Heckmann¹

¹ Dept. of General Pediatrics and Neonatology, ² Institute of Medical Statistics, Justus Liebig University, 35385 Giessen, Germany; ³ Dept. of General Pediatrics and Neonatology, University of Saarland, 66421 Homburg/Saar, Germany

Short title: Urinary steroid excretion in preterm infants

Key words: preterm infant, adrenal, glucocorticoid, gas chromatography, mass spectrometry

Corresponding and reprint request author: Matthias Heckmann MD, Dept. of General Pediatrics and Neonatology, Justus Liebig University, 35385 Giessen, Germany.

Phone: +49-641-9943400. Fax: +49-641-9943419.

E-mail Matthias.Heckmann@paediat.med.uni-giessen.de.

Abbreviations and steroid nomenclature (trivial name (abbreviation; systematic name)):

Cortisol production rate(s) (CPR); hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPAA); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); score for neonatal acute physiology (SNAP);

Glucocorticoid metabolites (GM): cortisol (F; 4-pregnene-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dione); 6 β -OH-cortisol (6 β -OH-F; 4-pregnene-6 β ,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-dione); tetra-hydrocortisol (THF; 5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-one), allotetrahydrocortisol (aTHF; 5 α -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-one); tetrahydrocortisone (THE; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dione); 1 β -OH-tetrahydrocortisone (1 β -OH-THE; 5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,21-tetrol-11,20-dione); 6 α -OH-tetrahydrocortisone (6 α -OH-THE; 5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,21-tetrol-11,20-dione); α -cortolone (α -CL; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α ,21-tetrol-11-one); 6 α -OH- α -cortolone (6 α -OH- α -CL; 5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,20 α ,21-pentol-11-one); β -cortolone (β -CL; 5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-one); 1 β -OH- β -cortolone (1 β -OH- β -CL; 5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,20 β ,21-pentol-11-one); 6 α -OH- β -cortolone (6 α -OH- β -CL; 5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,20 β ,21-pentol-11-one); β -cortol (β -C; 5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,20 β ,21-pentol); α -cortol (α -C; 5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,20 α ,21-pentol);

Abstract.

Background. Data on the adrenal stress response of more mature preterm infants between 30 and 36 wks are inconsistent. **Objective.** The objective was to test the hypothesis that there is a positive association between illness severity and cortisol production rates (CPR) in preterm infants > 30 wks. **Patients and Methods.** In a prospective longitudinal observational study glucocorticoid metabolites (GM) were profiled by gas chromatography-mass spectrometry in 24-h urinary samples. Excretion rates of GM were summed to calculate CPR in 61 well (mean \pm SD: 33.6 \pm 1.7wks) and 20 ill (33.2 \pm 1.6wks) preterm infants. Illness severity was measured by the score for neonatal acute physiology (SNAP). **Results.** During the 1st week of life, SNAP were higher in the group of ill compared to well infants. Medians of CPR (μ g/kg/d per mg creatinine) in ill (well) infants were at 1st day: 31 (28); 2nd day: 24 (28), 3rd day: 27 (26); 5th day: 28 (17); 2nd week: 20 (19); 3rd week: 17 (19); 4th week: 16 (16) and 2nd month: 17 (23). There was a significant association between the maximum of SNAP and the maximum of CPR (OR 3.7, 95%CI 1.2-11.5); p=0.02) in a logistic regression model which comprised gestational age, mode of delivery, gender and the administration of prenatal steroids as co-variables. **Conclusion.** There was a positive association between severity of illness and CPR in preterm infants > 30 wks, indicating a maturation of the adrenal stress response.

Introduction.

A relative adrenal insufficiency is meanwhile discussed not only in the very immature preterm infant of less than 30 weeks gestational age [1] but also in the term neonate [1, 2]. However, the majority of preterm infants who are treated in the neonatal unit comprise the more mature infants between 30 and 36 weeks of gestational age. Data on the adrenal stress response during neonatal illness in this group of patients are inconsistent.

In preterm infants with a mean gestational age of 32 weeks, significant higher cortisol values are reported in infants with respiratory distress syndrome compared to controls suggesting an appropriate adrenal stress response [3]. Increased cortisol concentrations directly after delivery support the view that the adrenal cortex is fully functioning preterm infants between 33 and 36 weeks of gestational age [4]. In contrast, others find no differences in plasma cortisol levels between preterm infants who are ventilated due to respiratory distress and control infants [5]. Finally, even significant lower cortisol concentrations are determined in preterm infants between 32 and 35 weeks gestational age who need treatment with surfactant compared to the control group [6].

The aim of this prospective study is twofold. At first, applying our recently developed non-invasive approach to determine cortisol production rates (CPR) [7] we want to investigate urinary excretion rates of glucocorticoid metabolites as an integral parameter of adrenal function in well and ill preterm infant > 30 weeks. Secondly, the results should be compared with our previous findings in more immature preterm infants < 30 wks [8].

Due to maturation of the adrenal stress response our hypothesis is that there will be a positive correlation between illness severity and CPR in preterm infants with a gestational age between 30 and 36 wks.

Patients and methods.

The study was approved by the Ethics Committee of the Justus Liebig University of Giessen and written informed parental consent was obtained.

Patients. Preterm infants with a gestational age > 30 weeks, who had no family history of adrenal illnesses and no major congenital anomalies, were eligible for the study. A postnatal steroid therapy was a criterion for exclusion. Gestational age was determined using the expanded Ballard score and/or obstetrical dating. Small for gestational age was defined as a birth weight less than the 10th percentile. A prenatal betamethasone therapy was recorded as being complete if 2 doses of 12 mg betamethasone were given to the mother more than 24 h ante partum.

Preterm infants were classified as being well according to our recently described criteria [9]. Well infants had no signs of infection and did not receive treatment with surfactant or inotropes. Ill preterm infants suffered from one or more of the following diseases: respiratory distress syndrome [10], early-onset infection (C-reactive protein > 10mg/l and symptoms of an infection during the first 72 h of life), ventricular hemorrhage according to the criteria of Papile [11]. To assess the severity of illness, all infants were scored using the Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) on each day when CPR were determined [12].

Urine collection procedure. 24-h urine collections were made frequently in the first week of life, i.e. at the first, second, third and fifth day of life, because severity of illness was expected to be highest in this period. Thereafter, 24-h urine collections were made at weekly intervals during the first month of life and then monthly up to discharge. The urine collection procedure has been described recently [7]. In brief, urine was collected for 24 hours using disposable nappies composed of pure cellulose (Pampers®, Procter & Gamble, Schwalbach, Germany). Weighing the nappies before and after urine collections allowed exact

calculation of 24-h urine output. Urine was extracted by compressing the nappies using a hydraulic press applying a maximum of 120 kPa/cm². After centrifugation, the collected urinary specimens were stored at – 80°C until analysis by GC-MS.

To assure completeness of urine collection, creatinine excretion rates were compared to recently published data from preterm infants [13].

Laboratory analyses. Urinary steroid profiles were determined by GC-MS analysis according to our procedure described recently [7]. The following C21-steroids – cortisol metabolites - were determined by selected ion monitoring: THE, α -CL, β -CL, 6 α -OH-THE, 1 β -OH-THE, 6 α -OH- α -CL, 6 α -OH- β -CL, 1 β -OH- β -CL, THF, aTHF, α -C, β -C, F and 6 β -OH-F. To assess overall cortisol secretion, these 14 major urinary glucocorticoid metabolites were quantified (peak area integration) and summed. Daily urinary excretion rates of glucocorticoids were corrected for body weight and per μ mol creatinine to take into account changes in glomerular filtration rate especially during the first week of life [7].

Statistics. All data were analyzed in an exploratory manner in the Institute of Medical Statistics using the SAS V8 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Preterm infants were separated into two groups based on their classification of being well or ill. Inter-group differences were compared with the Mann-Whitney U test or median test as appropriate for continuous variables and the Fisher's exact test for categorical data. Logistic regression analysis was used to investigate the effect of the severity of illness measured by SNAP and co-variables on the maximum CPR. Spearman rank analysis was used to analyse the change of CPR compared to body weight during growth. We considered $p < 0.05$ as significant. In some situations multiple comparisons were necessary, thus, the computed p-values are only a measure of reproducibility.

Results.

Patients. Seventy-nine preterm infants with a gestational age of 30 - 36 weeks were included in the study between November 2001 and November 2002. The distribution of potential confounding variables (gestational age, gender, administration of prenatal steroids and mode of delivery) were similar in well (n = 59) and ill (n = 20) infants (Tab. 1). Ill preterm infants suffered from respiratory distress syndrome (n=11, 55%), early-onset infection (n=12, 60%) and mild intraventricular hemorrhage grade I (n=2, 12%).

Influence of severity of illness on cortisol production. The highest severity of illness was measured in the first week of life. In this period, SNAPs were significantly higher in ill preterm infants compared to control infants except the 2nd day (Fig. 1B). Urinary CPR corrected for creatinine excretion are given in figure Fig. 1A. In order to take the individual stress response of each infant into account, we analyzed the influence of severity of illness measured by SNAP on the adrenal response in a model using logistic regression analysis. Table 2 summarizes the results of the analysis, in which the maximum of CPR corrected for creatinine excretion (median (range): 32.3 (6.0 – 136.0) $\mu\text{g}^{-1}\text{kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ mg creatinine⁻¹) dichotomized at the median served as the dependent variable. During the first week of life, maximum of SNAP was measured at median day 2 and maximum of CPR at median day 3, respectively. There was a significant positive influence of the maximum of SNAP (median (range): 5 (0 - 18)) on the maximum of CPR. Gestational age was the only co-variable with a significant inverse relationship to the maximum of CPR. Additional analyses including the same co-variables showed a significant influence of severity of illness measured by SNAP on the magnitude of the increase of CPR (p=0.005, n=36) and the slope of CPR (i.e. the increase of CPR divided by the difference in time between the first day of life and the day when the maximum of CPR was determined; p=0.02, n= 36), respectively.

Longitudinal pattern of cortisol production. After day 5 preterm infants started to gain weight (Fig. 1C). This was not accompanied by a significant change in CPR (spearman rank analysis).

Comparison of cortisol production. Figure 2 compares CPR between preterm infants > 30 wk and preterm infants < 30 wk [8]. Median CPR were significantly higher in the more immature infants by factor 1.5 to 3.

Discussion.

In contrast to preterm infants < 30 weeks [8], we found a positive association between severity of illness and CPR in preterm infants with a gestational age between 30 and 36 weeks, indicating a maturation of the adrenal stress response. The significant association between severity of illness measured by SNAP and the maximum of CRP in these more mature preterm infants was found although levels of SNAP (max. median 5) were four times lower compared to SNAP of preterm infants of less than 30 wks gestational age (max. median 22) [8].

To our knowledge, this is the first study which investigates adrenal function in a relatively large number of preterm infants between 30 and 36 weeks using the integral measurement adrenal function by determining urinary adrenal steroids using GC-MS. Our findings are in accordance with previous findings in this gestational age group, where significantly higher plasma cortisol levels were found in ill infants compared to well infants [3, 14]. However, another study did not report a rise of cortisol but elevated cortisol precursors in a small group of preterm infants with respiratory distress [5]. Scott et al demonstrated even lower cortisol levels in infants of 32-35 wks gestational suffering from respiratory disease [6].

The maturation of adrenal function was concurrently associated with significantly lower CPR compared to preterm infants < 30 weeks of the same postnatal age [8]. In accordance, previous studies showed that

gestational is conversely related to plasma cortisol concentrations [6, 9]. This may lead to the speculation, that the adrenal axis is maximally activated in the more immature infants < 30 wks gestational age whose illness severity is significantly higher than those of preterm infants of > 30 weeks gestational age. However, if we postulate that the gestationally older infant has more mature control over cortisol production, then higher cortisol production rates may not necessarily reflect an appropriate stress response. These findings may also be consistent with a state of immature feedback regulation in preterm infants of less than 30 weeks gestational age. A third speculation could be that there is decreased tissue sensitivity to cortisol requiring higher cortisol concentrations for normal cortisol action in the most immature infants. The latter is also observed in another endocrine system of preterm infants, i.e. increased insulin resistance and delayed insulin secretion in the most premature infants [15, 16]. In the more mature infants of more than 30 wks gestational age we found the maximum of CPR at median day 3, whereas the maximum of CPR was not reached before the 2nd and 3rd week of life in preterm infants of less than 30 wks [8].

No effect of postnatal growth on CPR is noted in our study, which is in contrast to our findings in preterm infants < 30 wks [8]. Perhaps an effect was missed because CPR were only determined until discharge, i.e. 2 – 3 months shorter than in the more premature infants.

Foetuses exposed to maternal glucocorticoid in late gestation are growth restricted with altered postnatal hypothalamus-hypophysis-adrenal axis responsiveness and glycemic responses that reproduce the insulin resistance of type 2 diabetes [17, 18]. Thus, if we assume that preterm infants between 30 and 36 wks gestational age have a more mature control over glucocorticoid action, i.e. stress responsiveness at low basal CPR, the practical meaning of our findings is to restrict treatment with

glucocorticoids in this gestational age group as it is recommended in more immature infants [19].

In conclusion, in contrast to more immature preterm infants of less than 30 wks gestational age, there was a positive association between severity of illness and CPR in preterm infants > 30 wks, indicating a maturation of the adrenal stress response. This maturation was concurrently associated with significantly lower basal CPR compared to infants < 30 wks.

Acknowledgment. The authors would like to thank M. Hartmann and S. Wudy for steroid analysis.

This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HE 3557/1-1).

References

5. Watterberg KL: Adrenocortical function and dysfunction in the fetus and neonate. *Semin Neonatol* 2004;9:13-21.
6. Fernandez E, Schrader R, Watterberg K: Prevalence of low cortisol values in term and near-term infants with vasopressor-resistant hypotension. *J Perinatol* 2005;25:114-118.
7. Economou G, Andronikou S, Challa A, Cholevas V, Lapatsanis PD: Cortisol secretion in stressed babies during the neonatal period. *Horm Res* 1993;40:217-221.
8. Doerr HG, Sippell WG, Versmold HT, Bidlingmaier F, Knorr D: Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life. *Pediatr Res* 1988;23:525-529.
9. Lee MM, Rajagopalan L, Berg GJ, Moshang T, Jr: Serum adrenal steroid concentrations in premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:1133-1136.
10. Scott SM, Watterberg KL: Effect of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. *Pediatr Res* 1995;37:112-116.
11. Heckmann M, Hartmann MF, Kampschulte B, Gack H, Bodeker RH, Gortner L, Wudy SA: Assessing cortisol production in preterm infants: do not dispose of the nappies. *Pediatr Res* 2005;57:412-418.
12. Heckmann M, Hartmann M, Kampschulte B, Gack H, Bödeker R-H, Gortner L, Wudy SA: Cortisol production rates in preterm infants in relation to growth and illness: a non invasive prospective study using GC-MS. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90 (10):5737-5742.
13. Heckmann M, Wudy SA, Haack D, Pohlandt F: Reference range for serum cortisol in well preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F171-174.
14. Giedion A, Haefliger H, Dangel P: Acute pulmonary X-ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and

- positive end-expiratory pressure (PEP). *Pediatr Radiol* 1973;1:145-152.
15. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H: Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr* 1978;92:529-534.
 16. Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldmann DA: Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics* 1993;91:617-623.
 17. Wilkins BH: Renal function in sick very low birthweight infants: 2. Urea and creatinine excretion. *Arch Dis Child* 1992;67:1146-1153.
 18. Gunes T, Koklu E, Ozturk MA, Koklu S, Cetin N: Evaluation of serum cortisol levels in a relatively large and mature group of ventilated and nonventilated preterm infants with respiratory distress syndrome. *Am J Perinatol* 2006;23:335-339.
 19. King RA, Smith RM, Dahlenburg GW: Long term postnatal development of insulin secretion in early premature infants. *Early Hum Dev* 1986;13:285-294.
 20. Mitanchez-Mokhtari D, Lahlou N, Kieffer F, Magny JF, Roger M, Voyer M: Both relative insulin resistance and defective islet beta-cell processing of proinsulin are responsible for transient hyperglycemia in extremely preterm infants. *Pediatrics* 2004;113:537-541.
 21. Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J: The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:135-144.
 22. Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C: Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1401-1406.
 23. American Academy of Pediatrics: Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants. *Pediatrics* 2002;109:330-338.

Table 1. Distribution of population characteristics of well and ill preterm infants

	„Well“ (=59)	Ill (n=20)	p
Gestational age [wk]*	33.5 (30.0-36.9)	33.3 (30.0-35.6)	0.36
Birth weight [g]*	1980 (1120-2920)	2055 (1090-2700)	0.68
Gender (female/male)	22 / 37	5 / 15	0.42
SGA	5 (8%)	3 (15%)	0.41
Prenatal glucocorticoids (complete course)	22 (37%)	5 (25%)	0.42
Prenatal glucocorticoids (complete and incomplete course)	27 (45%)	7 (35%)	0.44
Caesarean section	57 (96%)	18 (90%)	1.0
Umbilical cord arterial pH*	7.3 (7.2-7.4)	7.3 (7.1-7.6)	0.30
Apgar scores at 5 min*	9 (5-10)	9 (1-10)	0.17

*Values presented as median and range. [#]Mann-Whitney U test. ^{##}Fisher's exact test. SGA small for gestational age.

Table 2. Logistic regression analysis of the effects of the score for neonatal acute physiology (SNAP) and different co-variables on the maximum of cortisol production rate corrected for creatinine excretion dichotomized at the median in preterm infants in the first week of life (n=67)

	OR	95% confidence limits		p
Maximum of SNAP (divided dichotomously at the median)	3.7	1.2	11,5	0,023
Gender (male vs female)	1.3	0.4	4,4	0.70
Gestational age (<33wks vs > 33wks)	11.4	6.7	58,5	0.0035
Prenatal steroids (non complete vs none)	0.2	0.02	1,6	0.13
Prenatal steroids (complete vs none)	0.2	0.04	1,1	0.064
Caesaerean section	0.2	0.03	2,0	0.19

OR odds ratio.

Fig. 1: Changes in urinary cortisol production rates (CPR) corrected for urinary creatinine excretion (A), severity of illness quantified by SNAP (B) and body weight (C) in well and ill preterm infants > 30 weeks gestational age as a function of postnatal age (median and inter-quartile range; * $p < 0.05$).

Fig. 2: Comparison of urinary cortisol production rates (CPR) corrected for urinary creatinine excretion (median and inter-quartile range) between preterm infants > 30 weeks gestational age and preterm infants < 30 weeks (8).

Fig 1 (Grofer B)

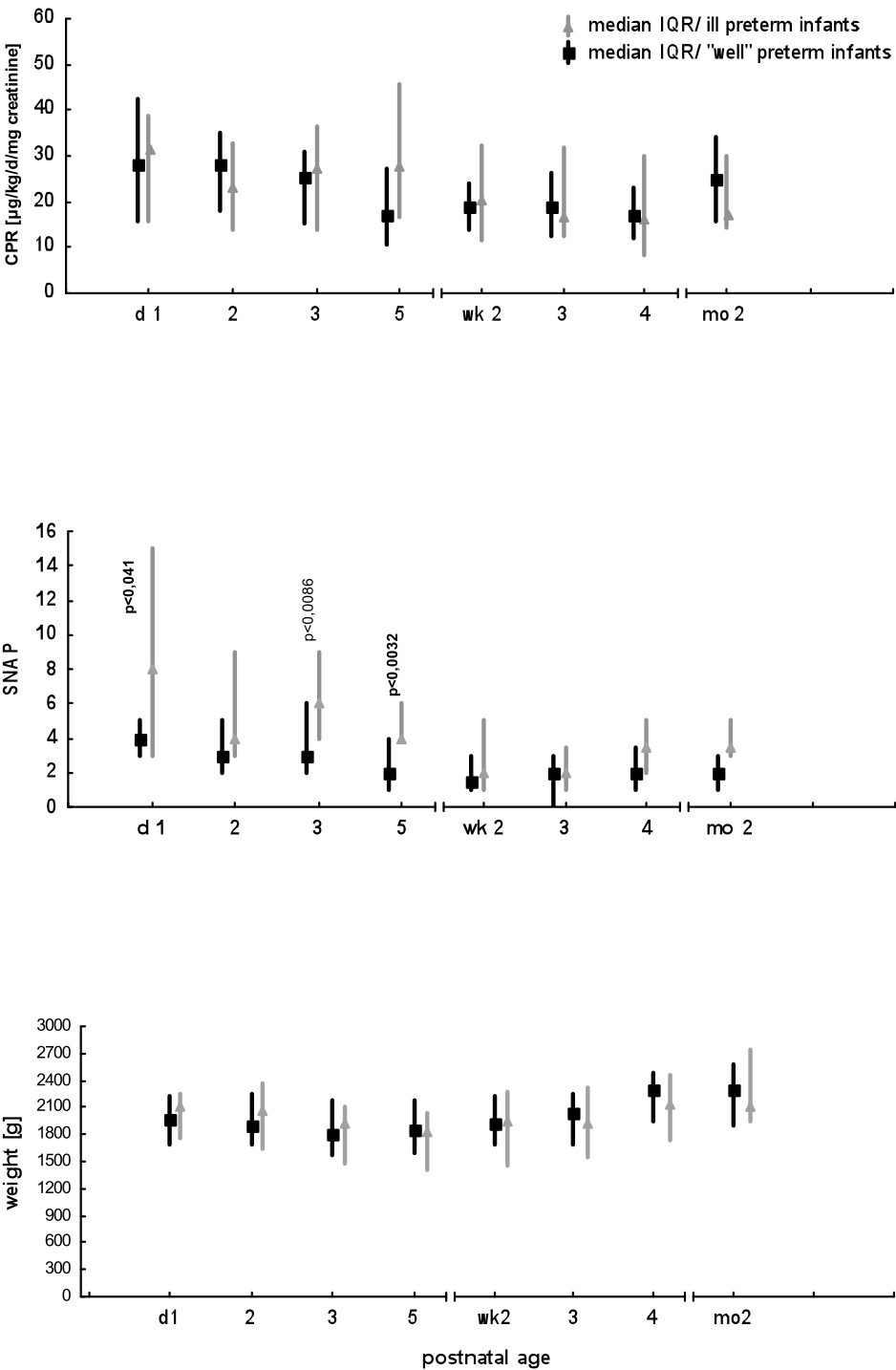
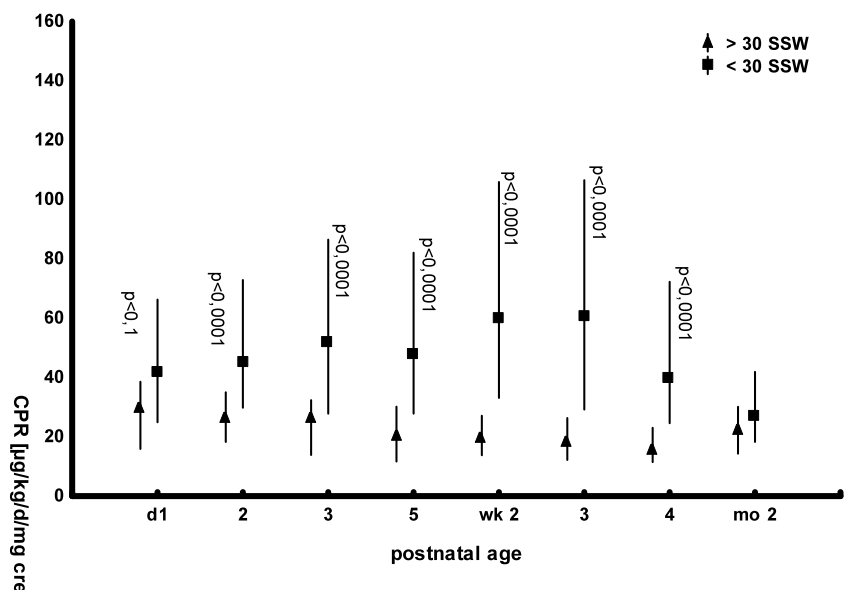


Fig 2 (Grofer B)



9.2. Score for neonatal acute physiology (SNAP)

Punkte	0	1	3	5
RR (MAD) (mmHg)		66-80 bzw. 30-35	81-100 bzw. 20-29	>100 bzw. < 20
HF		180-200 bzw. 80-90	201-250 bzw. 40-79	> 250 bzw. < 40
Atemfrequenz		60-100	> 100	
Temperatur (°C)		35-35,5	33,3-34,9	< 33,3
PO2 (mmHg)		50-65	30-50	< 30
PO2/FIO2		2,5-3,5	0,3-2,49	< 0,3
PCO2 (mmHg)		50-65	66-90	>90
OI=MAPx F_{IO_2} / a_{rtpaO_2}		0,07-0,2	0,21-0,4	>0,4
HK (%)		66-70 bzw. 30-35	> 70 bzw. 20-29	< 20
Leukos (x 1.000)		2,0-5,0	<2,0	
ITQ		>0,21		
Neutrophile Granulozyten		500-999	< 500	
Thrombos (x 1.000)		30-100	0-29	
Blut-Harnstoff (mg/dl)		40-80	>80	
Kreatinin (mg/dl)		1,2-2,4	2,5-4,0	>4,0
Urinausscheidung (ml/kg/h)		0,5-0,9	0,1-0,49	<0,1
Indir. Bili (bei Geburtsgewicht) >2kg (mg/dl) <2kg (mg/dl)		15-20 5-10	>20 >10	
dir. Bili (mg/dl)		>2		
Natrium (mmol/l)		150-160 bzw. 120-130	161-180 bzw. < 120	>180
Kalium (mmol/l)		6,6-7,5 bzw. 2,0-2,9	7,6-9,0 bzw. <2,0	>9,0
Calcium ionisiert (mmol/l)		>3,5 bzw. 0,2-0,25	<0,2	
Calcium total (mmol/l)		>3 bzw. 1,25-1,73	<1,25	
Blutzucker (mg/dl)		150-250 bzw. 30-40	>250 bzw. <30	
Serumbicarbonat (mmol/l)		>33 bzw. 11-15	< 10	
Serum pH		7,2-7,3	7,1-7,19	<7,1
Krampfanfall		singulär	multiple	
Apnoe		nicht beatmet	C-PAP	Intubiert
Blut im Stuhl		positiv		

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Bianka Grofer

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

In erster Linie danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Heckmann für die Überlassung des Themas, für wertvolle Anregungen, konstruktive Kritik und sein unermüdliches Engagement bei der Betreuung.

Herrn Prof. Dr. S. Wudy danke ich für die Messung der Urinproben in dessen Steroidforschungslabor, sowie Michaela Hartmann für deren Mithilfe.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. R.-H. Boedeker sowie Frau Christine Scheibelhut für die Beratung und Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Den Schwestern der Station Moro möchte ich für ihre unkomplizierte Hilfe bei der praktischen Durchführung der Studie danken.

Herrn Henrik Kropp danke ich dafür, dass er dem Format dieser Arbeit den letzten Schliff gegeben hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und damit diese Arbeit erst ermöglicht haben. Und die mich vor allem in schwierigen Phasen immer wieder dazu ermuntert haben weiterzumachen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Tobias, der diese Arbeit geduldig unzählige Male durchgesehen hat, der nie müde wurde mich moralisch zu unterstützen und mir immer den Rücken freigehalten hat.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**